



MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS

***GENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA E ASPECTOS
INFLAMATÓRIOS NA ANEMIA FALCIFORME***

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS

***GENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA E ASPECTOS
INFLAMATÓRIOS NA ANEMIA FALCIFORME***

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI

COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA BLOTTA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, na área de concentração Ciências Biomédicas.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MAGNUN
NUELDO NUNES DOS SANTOS E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA SONATI.**

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Depto. de Patologia Clínica / Faculdade de Ciências Médicas / UNICAMP

CAMPINAS – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Sa59g Santos, Magnun Nueldo Nunes dos, 1984-
Genótipos da haptoglobina e aspectos inflamatórios
na anemia falciforme / Magnun Nueldo Nunes dos
Santos. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Maria de Fátima Sonati.
Coorientador : Maria Heloisa de Souza Lima Blotta.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hemoglobinopatias. 2. Mediadores da
inflamação. 3. Polimorfismo genético. 4. Expressão
gênica. I. Sonati, Maria de Fátima, 1958-. II. Blotta,
Maria Heloisa de Souza Lima, 1953-. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Haptoglobin genotypes and inflammatory aspects in sickle cell anemia.

Palavras-chave em inglês:

Hemoglobinopathies
Inflammation mediators
Polymorphism, Genetic
Gene expression

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Maria de Fátima Sonati [Orientador]
Maria Stella Figueiredo
Marcos Borato Viana
Mônica Barbosa de Melo
André Fattori

Data da defesa: 26-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

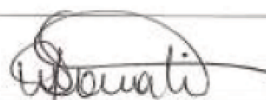
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS

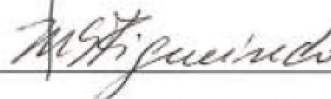
Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA DE FÁTIMA SONATI

MEMBROS:

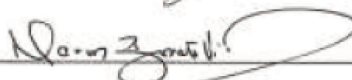
1. PROF(A). DR(A). MARIA DE FÁTIMA SONATI



2. PROF(A). DR(A). MARIA STELLA FIGUEIREDO



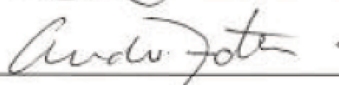
3. PROF(A). DR(A). MARCOS BORATO VIANA



4. PROF(A).DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO



5. PROF(A).DR(A). ANDRÉ FATTORI



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

Data: 26/02/2013

DEDICATÓRIA

À minha esposa maravilhosa, Dulcinéia, pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por estar gerando em seu ventre o meu filho, Guilherme. Aos meus pais, Osvaldo e Cila, por sempre terem incentivado e dado condições para uma ótima educação da nossa família e pelo exemplo de vida, honestidade e de amor que tens nos passado constantemente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por ter conquistado mais essa bênção na minha vida e, sobretudo, por ter colocado pessoas admiráveis no meu caminho pessoal e profissional.

À minha esposa Dul por ter ficado ao meu lado durante essa jornada e pelos ensinamentos e por toda ajuda para a realização deste trabalho. E ao meu filho Guilherme por ter me acalmado com os seus chutes de dentro da barriga da mamãe, principalmente, na reta final da tese.

À minha Família Salgueirense (Osvaldão, Dona Cila, Benício, Magda, Bruno, Lipe, Gabriela, Giovana, Grazielle e João Filipe) que soube compreender a minha distância física e sempre me apoiou durante esse período.

À minha Família Araraquarense (Sr. Eugênio, Dona Amália, Tia Adelina e Lu) por todo incentivo, apoio e pelos momentos de descontração nos finais de semana.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati, minha orientadora e amiga, pessoa que estimo pela sua sabedoria, competência e profissionalismo. Agradeço pela confiança depositada em mim, desde o nosso primeiro contato (Recife-2005) e por todo apoio demonstrado em todos os momentos. Com muito carinho e admiração, muito obrigado!

À Profa. Dra. Heloisa Blotta, minha coorientadora, outro exemplo de serenidade, dedicação e competência.

Ao Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo, pela contribuição significativa para o desenvolvimento desta pesquisa e por ser um pesquisador muito preocupado com a qualidade de vida dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa pela colaboração nesta pesquisa.

À Banca Examinadora deste trabalho, Profa. Dra. Stella Figueiredo, Prof. Dr. Marcos Borato, Profa. Dra. Mônica Melo e Prof. Dr. André Fattori, pela gentileza em participar da minha banca, pelas observações/sugestões e pelo tempo despendido para avaliar a minha tese de doutorado, que sem dúvida, contribuíram significativamente para o seu enriquecimento.

Aos professores suplentes, Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula, Prof. Dr. Aderson Cunha e Profa. Dra. Márcia Wenning pelas observações/sugestões durante a pré-banca.

Aos grandes amigos do laboratório Daniela, Tânia, Natália, Denise, Elzinha, Isa, Gisele e Susan, pela amizade firmada, pelos momentos de descontração e pela troca de experiência.

À Dra. Paula Botini, Dra. Célia Garlipp e a Dra. Almerinda Alves pela ajuda valiosa na discussão dos resultados de filtração glomerular.

Aos amigos que contribuíram de forma valiosa e fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa: Marcos André, Dulcinéia Albuquerque, Carolina Lanaro, Rômulo Oliveira, Tânia Zaccariotto, Daniela Ribeiro, Regiane Ferreira, Tânia Machado, Satiko Nagamati, Dr. Erich Vinícius, Dr. Kleber Fertrin, Dra. Heloisa Blotta e, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos alunos de IC, Mariana Lopes e Eliel Faber, meus dois primeiros coorientados.

Aos amigos Emanuel, Bruno, Tiago, Cayo Bruno, Mariana, Marcos André, Betânia, Igor, Ucha, Andrey, Flávia Pallis, Flávia, Dani Pinheiro, Mário, Carla e Marcinha Aguiar, pela amizade, companheirismo e os bons momentos compartilhados.

Ao Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE), aos amigos que lá trabalham e a todo o pessoal do Laboratório de Hemoglobinopatias.

À Cleide Aparecida Moreira Silva e Helymar Machado, do serviço de Bioestatística da Câmara de Pesquisa da FCM/Unicamp, pela assessoria e execução das análises estatísticas, e pelo profissionalismo.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	25
1.1 As Hemoglobinas Humanas.....	27
1.2 Os Genes das Globinas.....	28
1.3 As Hemoglobinopatias.....	29
1.4 Anemia Falciforme.....	29
1.5 Fisiopatologia e Aspectos Clínicos da AF.....	30
1.6 Moduladores genéticos da AF.....	42
1.7 Candidatos a moduladores da gravidade clínica da AF.....	44
2. OBJETIVOS	59
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	63
3.1 Casuística.	65
3.2 Aspectos Éticos da Pesquisa.	65
3.3 Separação das amostras.....	66
3.4 Métodos.	67
3.4 Análises Estatísticas.	83
4. RESULTADOS	85
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÕES	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
8. ANEXOS	147

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para determinar a deleção de 32 pb no gene o polimorfismo CCR5 Δ 32.....	69
Tabela 2: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a avaliação da expressão gênica.....	77
Tabela 3: Concentração dos <i>primers</i> e eficiência obtida para a reação de qPCR.....	78
Tabela 4: Sequências dos miRNAs utilizados no ensaio de expressão.....	83
Tabela 5: Distribuição dos 92 pacientes com AF pelos genótipos da Hp, idade e gênero.....	87
Tabela 6: Dosagens plasmáticas/séricas de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e da CRP e a taxa de expressão gênica de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , Hp e do miR-155.....	88
Tabela 7: Dosagens séricas das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e s L-electina.....	89
Tabela 8: Dosagens dos marcadores de disfunção endotelial (FvW:Ag) e de hipercoagulabilidade (Dímeros-D).....	89
Tabela 9: Frequência dos eventos clínicos distribuídos entre os 92 pacientes com AF.....	90
Tabela 10: Variáveis laboratoriais coletadas dos prontuários médicos dos pacientes com AF.....	91
Tabela 11: Distribuição dos pacientes em relação aos grupos sanguíneos (grupo O e não-O) entre os genótipos da Hp.....	95
Tabela 12: Comparação dos marcadores avaliados entre os pacientes sem e	

com o histórico de úlceras de perna.....	101
Tabela 13: Distribuição dos pacientes que apresentaram ou não histórico de úlceras de perna entre os genótipos da Hp.....	103
Tabela 14: Regressão de Cox univariada para os fatores associados à presença de úlcera de perna.....	104
Tabela 15: Coeficientes de correlação linear de Spearman relacionando as dosagens plasmáticas/séricas, expressões gênicas e os parâmetros laboratoriais..	105

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Representação da estrutura tetramérica da molécula de Hb humana....	27
Figura 2: Mecanismo fisiopatológico da anemia falciforme.....	31
Figura 3: Representação esquemática da endocitose do complexo Hp-Hb pelos macrófagos.....	46
Figura 4: Representação esquemática da estrutura dos genes da Hp. Os <i>boxes</i> indicam os éxons.....	47
Figura 5: Representação esquemática das diferentes estruturas protéicas correspondentes aos três fenótipos da Hp.....	49
Figura 6: Modelo do papel do genótipo da Hp na determinação da resposta inflamatória.....	51
Figura 7: Biogênese do miRNA.....	55
Figura 8: Representação esquemática da separação de células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico com duas densidades de <i>Ficoll-Hypaque</i>	67
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação dos produtos específicos para cada alelo da Hp.....	68
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose identificando o polimorfismo CCR5 Δ 32.....	70
Figura 11: Amplificação de um fragmento de 640 pb do gene ACTB de amostras de cDNA dos monócitos de pacientes com AF.....	76
Figura 12: Análise da eficiência da reação de amplificação.....	79
Figura 13: Curva de dissociação para analisar a qualidade da reação e ausência	

de contaminantes.....	81
Figura 14: Dosagens plasmáticas ou séricas das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (pg/mL) e da CRP (mg/dL) entre pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp.....	92
Figura 15: Dosagens plasmáticas das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sL-Selectina entre pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp.....	93
Figura 16: Dosagens plasmáticas do FvW:Ag (%) e do Dímeros-D (μ g/mL), em pacientes com AF, de acordo com o genótipo da Hp.....	94
Figura 17: Expressão do miR-155 em polimorfonucleares de pacientes com AF divididos de acordo com os genótipos da Hp (12 pacientes/genótipo).....	96
Figura 18: Expressão dos genes IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , HP e miR-155 em células mononucleares de pacientes com AF entre os diferentes genótipos da Hp.....	97
Figura 19: Níveis séricos de creatinina (mg/dL) e taxa de filtração glomerular (ml/min), calculada pelo método MDRD, em pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp.....	98
Figura 20: Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL) (A) e a eTFG (mL/min/1,73m ²) (B) no subgrupo de pacientes com AF (\geq 27 anos) de acordo com os genótipos da Hp.....	99
Figura 21: Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL) (A) e a eTFG (mL/min/1,73m ²) (B), no subgrupo de pacientes com AF (< 27 anos) de acordo com o genótipo da Hp.....	100
Figura 22: Dosagens da IL-8, CRP e a contagem de reticulócitos, em pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme
Hp	Haptoglobina
Hb	Hemoglobina
HP	Alelo da Hp
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
VCAM	Molécula de adesão da célula vascular-1
ICAM	Molécula de adesão intercelular-1
FvW	Multímeros do Fator de von Willebrand de alto peso molecular
FvW:Ag	Antígeno do Fator de von Willebrand
CRP	proteína C reativa
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELFA	<i>Enzyme Linked Fluorescence Assay</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR em tempo real
HBB*S	Gene da globina β^S
DF	Doença Falciforme
NO	Óxido Nítrico
HO	Heme-oxigenase
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
HUVEC	Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
FT	Fator Tecidual
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
TAT	Complexo Trombina-Antitrombina (TAT)
ADAMTS13	<i>a disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs</i>

AVE	Acidente Vascular Encefálico
HbF	Hemoglobina Fetal
CAR	Haplótipo da República da África Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
GWAS	Estudos de Associação Ampla do Genoma
BCL11A	Gene <i>B-cell CLL/lymphoma 11A</i>
HBS1L-MYB	Região intergênica no cromossomo 6. Localizada entre os genes <i>HBS1-like</i> e <i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog</i>
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito
Hm	Hemácias
UGT1A1	Gene <i>UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1</i>
MTHFR	Gene <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>
KLF1	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>
kDa	<i>kilodaltons</i>
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
CKII	caseína Kinase II
CCR5	Gene <i>C-C chemokine receptor type 5</i>
RNAm	RNA mensageiro
miRNAs	microRNAs
Lin4	<i>Lineage-deficient-4</i>
pri-miRNA	miRNA primário
pré-miRNA	miRNA precursor
RISC	Complexo protéico <i>RNA-induced silencing complex</i>
SHIP-1	<i>Src homology 2-containing inositol phosphatase-1</i>
ARE	Elemento de resposta antioxidante
NRF2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GPX1	Glutathione Peroxidase 1
GSH	Glutathione
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
UV	Ultravioleta
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
cDNA	DNA complementar
ACTB	Gene da beta actina
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
NTC	<i>No Template Controls</i>
Cq	<i>Quantification Cycle</i>
Tm	<i>Temperatura de melting</i>
FN	Fator de Normalização
Q	Quantificação relativa
UA	Unidade Arbitrária de expressão
EPM	Erro Padrão da Média
CVO	Crise Vaso Oclusiva
NACF	Necrose Asséptica Cabeça Fêmur
eTFG	Estimativa da taxa de filtração glomerular
MDRD	<i>Modified Diet in Renal Disease</i> (fórmula para calcular a eTFG)
DM	<i>diabetes mellitus</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
CD163	Receptor do complexo Hp-Hb

RESUMO

Estudos recentes sobre o papel da inflamação na fisiopatologia da anemia falciforme (AF) sugerem que o equilíbrio da resposta imune Th1/Th2, relacionado ao perfil de citocinas produzidas, pode influenciar a morbidade nos portadores dessa doença. A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína plasmática cuja função primordial é ligar-se à hemoglobina (Hb) livre no plasma para prevenir a excreção renal de ferro e os efeitos oxidativos resultantes de sua presença no vaso. Além disso, é uma proteína de fase aguda positiva, com propriedades imunomodulatórias. Dois alelos codominantes, HP1 e HP2, resultam em três genótipos/fenótipos principais, Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2, que correspondem a proteínas com características físico-químicas e eficiências distintas. O objetivo do presente estudo foi avaliar se os genótipos da Hp poderiam influenciar o estado inflamatório na AF por meio da comparação dos níveis de determinados parâmetros a ele relacionados. Para isso, foram comparados os níveis plasmáticos ou séricos e/ou as taxas de expressão gênica (em células mononucleares) dos mediadores imunológicos IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sL-selectina, do antígeno do Fator de Von Willebrand (FvW:Ag), dos Dímeros-D, da proteína C reativa (CRP), do microRNA-155 (miRNA-155) e do gene HP (ambos em células mononucleares e polimorfonucleares) em 92 pacientes adultos com AF acompanhados no Hemocentro de Pernambuco, subdivididos em Hp1-1 (n=27), Hp2-1 (n=37) e Hp2-2 (n=28). Os valores obtidos e os genótipos de Hp foram ainda comparados com dados clínicos e laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) oriundos dos prontuários dos pacientes. Além disso, a presença do polimorfismo CCR5 Δ 32, relacionado a resposta inflamatória, foi investigada nesses pacientes. As taxas de expressão

gênica e os níveis plasmáticos/séricos foram quantificados por PCR em tempo real (qPCR) e ELISA, respectivamente, enquanto os genótipos de Hp e o polimorfismo CCR5Δ32 foram investigados por reações de PCR. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos da Hp quando comparados os níveis plasmáticos/séricos dos mediadores imunológicos, das moléculas de adesão, da CRP e dos Dímeros-D, e tampouco da expressão gênica de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, HP e do miRNA-155. Em contrapartida, foi observada uma diminuição significativa do FvW:Ag (p=0,018) no grupo de pacientes com o genótipo Hp2-2, o que pode sugerir maior disfunção endotelial; diminuição significativa da concentração plasmática de creatinina e tendência ao aumento da estimativa da Taxa de Filtração Glomerular (eTFG) (p=0,08) em um subgrupo de pacientes com idade ≥ 27 anos (mediana da idade) com genótipo Hp2-2. Com relação ao histórico de úlceras de perna, observamos que esse evento clínico estava relacionado a níveis significativamente aumentados de IL-8, CRP e contagem de reticulócitos, mas não aos genótipos de Hp. De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo no Brasil a investigar se o polimorfismo da Hp pode influenciar a resposta inflamatória na AF. Com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que ele, em associação a muitos outros fatores genéticos e ambientais, também contribua para a diversidade clínica dessa doença. No entanto, estudos experimentais serão necessários para essa investigação.

ABSTRACT

Recent studies on the role of inflammation in the pathophysiology of sickle cell anemia (SCA) suggest the Th1/Th2 balance of the immune response, relating to the profile of cytokines produced, may influence the morbidity in patients with SCA. Haptoglobin (Hp) is a plasma glycoprotein whose primary function is to bind to free hemoglobin (Hb) in the plasma, preventing excretion of iron by the kidneys and protecting blood vessels from its oxidative effects. Moreover, it is also an acute phase positive protein with immunomodulatory properties. Two codominant alleles, HP1 and HP2, result in three main genotypes/phenotypes, Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2, which correspond to proteins with different functional characteristics. The aim of this study was to evaluate whether the Hp genotypes may influence the inflammatory state in SCA by comparing the levels of certain parameters related to it. For this purpose, we compared the plasma or serum and/or rates of gene expression (in mononuclear cells) of immune mediators IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α , adhesion molecules sVCAM-1, sICAM-1 and sL-selectin, antigen von Willebrand Factor (vWF: Ag), D-dimers, C-reactive protein (CRP), microRNA-155 (miRNA-155) and Hp gene (both in mononuclear and polymorphonuclear cells) in 92 adult patients with SCA followed up at the Blood Center of Pernambuco, subdivided in Hp1-1 (n = 27), Hp2-1 (n = 37) and Hp2-2 (n = 28). The values obtained and the Hp genotypes were also compared to clinical and laboratory (hematology and biochemistry) data from patients' records. Furthermore, the presence of polymorphism CCR5 Δ 32, related to inflammatory response, was investigated in these patients. The rates of gene expression and serum/plasma were quantified by real time PCR (qPCR) and ELISA, respectively, while the Hp genotypes of

polymorphism and CCR5 Δ 32 were investigated by PCR reactions. There were no statistically significant differences between Hp genotypes compared to plasma/serum levels of immune mediators, adhesion molecules, CRP and D-dimers, and neither the gene expression of IL-1 β , IL-6, IL -8, IL-10, TNF- α , HP and miRNA-155. On the other hand, we observed a significant decrease of vWF:Ag (p=0.018) in patients with genotype Hp2-2, which may suggest greater endothelial dysfunction; significant decrease in plasma creatinine and a tendency to increasing the estimate of the Glomerular Filtration Rate (eGFR) (p = 0.08) in a subgroup of patients aged \geq 27 years (median age) with Hp2-2 genotype. In regard to the history of leg ulcers, this clinical event was related to significantly increased levels of IL-8, CRP and reticulocyte count, but not to Hp genotypes. To our knowledge, this is the first study in Brazil that investigated whether the Hp polymorphism may influence the inflammatory response in SCA. Based on the data obtained, it is possible to suggest that, in combination with many other genetic and environmental factors, the Hp genotype also contribute to the clinical diversity of this disease. However, experimental studies will be needed for this investigation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 AS HEMOGLOBINAS HUMANAS

As hemoglobinas (Hb) humanas são proteínas tetraméricas de estrutura globular, com peso molecular de 64.500 daltons, compostas por quatro cadeias polipeptídicas (cadeias de globina), cada uma delas associada a um grupo prostético heme (Figura 1), que contém um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{++}) capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio, e desempenhar sua função primordial de transporte do oxigênio dos pulmões para os tecidos (Perutz et al., 1960; Bunn & Forget, 1986). Cada molécula de Hb é formada por duas cadeias globínicas do tipo alfa - α ou ζ - e duas do tipo beta - β , δ , γ ou ϵ . Milhares de mutações podem ocorrer e alterar a sequência primária de aminoácidos dos polipeptídeos de globina e, por vezes, resultar em doenças clinicamente significativas denominadas por hemoglobinopatias (Steinberg, 2008).

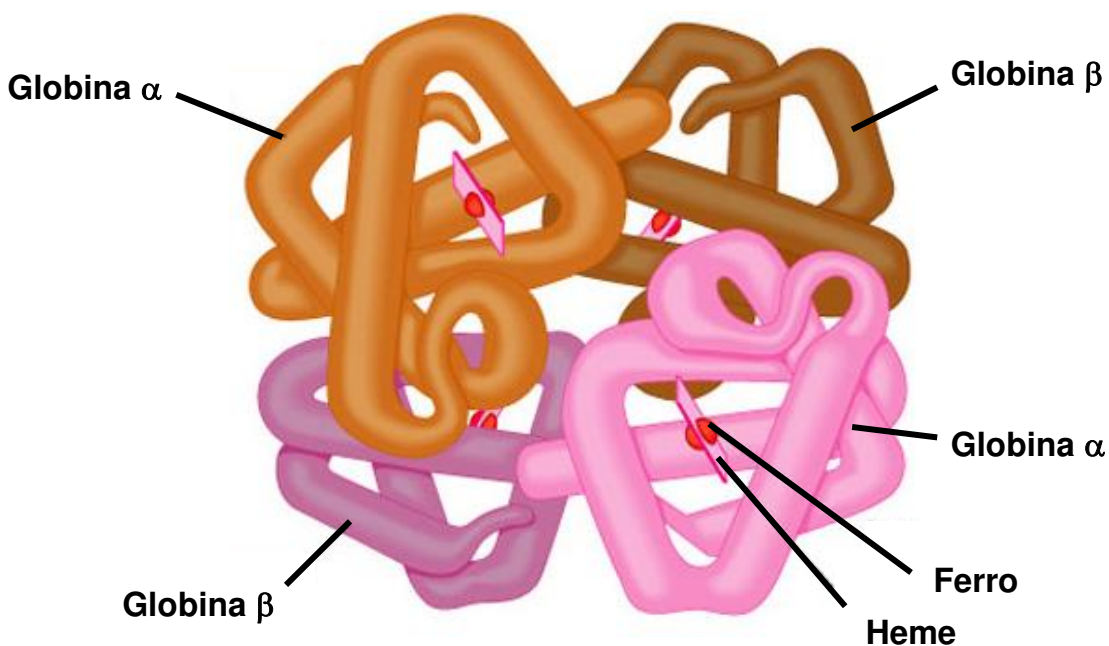


Figura 1: Representação da estrutura tetramérica da molécula de Hb humana. Cada globina está associada a um grupo prostético heme (figura adaptada do *site*: <http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/organic.htm>).

1.2 OS GENES DAS GLOBINAS

Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão agrupados em dois *clusters* multigênicos localizados nos braços curtos dos cromossomos 11 (que codifica as globinas do tipo β) e 16 (que codifica as globinas do tipo α) (Hill & Wainscoat, 1986; Higgs et al., 2012). Esses genes responsáveis pela codificação das cadeias globínicas são compactos e de estrutura similar entre eles, com cerca de 1 a 2 kilobases (kb) de DNA, organizados em 3 éxons e 2 íntrons (Hill & Wainscoat, 1986; Higgs et al., 1989).

Nos *clusters*, esses genes estão organizados ao longo dos cromossomos na ordem em que se expressam durante o desenvolvimento humano, produzindo assim, diferentes tetrâmeros de Hbs (Higgs et al., 2012). O *cluster* β (11p15.5) inclui o gene embrionário ϵ , dois genes de globina fetal, γ^G e γ^A , um pseudogene ($\psi\beta$) e dois genes de globinas adultas, δ e β , dispostos na ordem: 5' - ϵ - γ^G - γ^A - $\psi\beta$ - δ - β - 3' (Hill & Wainscoat, 1986). O *cluster* α (16p13.3) é formado pelo gene embrionário ζ , os pseudogenes $\psi\zeta$ e $\psi\alpha_1$, os genes da globina α duplicados (α_2 e α_1) e os genes θ e α^D (também conhecido como μ), dispostos na seguinte ordem: 5' - ζ - $\psi\zeta$ - μ - $\psi\alpha_1$ - α_2 - α_1 - θ - 3' (Harteveld & Higgs, 2010). Os produtos proteicos destes genes serão responsáveis pela formação dos diferentes tipos de Hbs: Embrionárias (Gower I - $\zeta_2\epsilon_2$, Gower II - $\alpha_2\epsilon_2$ e Portland I - $\zeta_2\gamma_2$), Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) e Adultas (Hb A - $\alpha_2\beta_2$ e Hb A₂ - $\alpha_2\delta_2$) (Hill & Wainscoat, 1986; Higgs et al., 1989).

A expressão dos genes de globina em ambos os *clusters* é regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento humano e de maneira tecido-específica (Higgs et al., 2012).

1.3 AS HEMOGLOBINOPATIAS

As doenças intrínsecas da Hb são denominadas hemoglobinopatias, as quais representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária. Do ponto de vista clínico, dois defeitos principais podem ocorrer: os estruturais (as variantes da Hb) e os de desequilíbrio no ritmo de síntese das cadeias globínicas (talassemias); com menor frequência, ambos os fenótipos podem estar associados. Entre os defeitos estruturais mais importantes está o da HbS ($\alpha_2\beta_2^{6 \text{ GLU} \rightarrow \text{VAL}}$), conhecida pela gravidade e frequência, particularmente entre os povos africanos ou afro-descendentes (Bunn & Forget, 1986).

1.4 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme (AF) foi descrita cientificamente pelo médico James Bryan Herrick, em 1910, em Chicago, no sangue do estudante de odontologia, Walter Clement Noel, negro oriundo da Ilha de Granada no Caribe (Savitt & Goldberg, 1989) e, em 1949, foi caracterizada como "a primeira doença molecular humana" por Pauling e colaboradores (Savitt & Goldberg, 1989; Orkin & Higgs, 2010; Pace et al., 2012). A AF é causada pela homozigose de uma única mutação (A \rightarrow T) no sexto códon do gene β (homozigose do gene *HBB**S). Devido a esta mutação, um resíduo de ácido glutâmico é substituído por um resíduo de valina (glu \rightarrow val) na sexta posição da cadeia polipeptídica da globina β (Serjeant, 1997; Steinberg, 2008). Estudos do *cluster* dos genes ligados ao da globina β sugerem que as mutações da HbS tiveram cinco origens distintas na África equatorial e, talvez, no Oriente Médio e na Índia; e depois se espalhou por todo o mundo de acordo com o deslocamento das populações através de guerras, comércio de escravos e migração voluntária (Nagel & Labie, 1989; Steinberg, 2008). O termo doenças falciformes (DF) é

utilizado para identificar condições em que a associação da HbS com outra alteração de Hb, estrutural ou talassêmica, leva a um quadro clínico similar ao da AF.

1.5 FISIOPATOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS DA AF

A base da fisiopatologia da AF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada que, por sua vez, leva à hemólise crônica evoluindo com processos vaso-oclusivos, os quais são observados em graus variados, ocasionando alguns fenótipos clinicamente mais graves do que outros. Isto é devido, em grande parte, à variação na concentração celular de HbS e à propensão para a formação de polímeros, que é altamente dependente da tensão de oxigênio (Steinberg, 2008) (Figura 2). Sob condições de baixas tensões de oxigênio, a HbS pode polimerizar formando estruturas filamentosas que se depositam no interior dos eritrócitos, modificando sua forma e tornando-os falcizados e reduzindo a deformabilidade celular. O fenômeno de falcização pode ser revertido quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos, no entanto, falcizações sucessivas alteram permanentemente a estrutura da membrana do eritrócito, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas (Smith et al., 1981; Antonarakis et al., 1984; Steinberg, 2008).

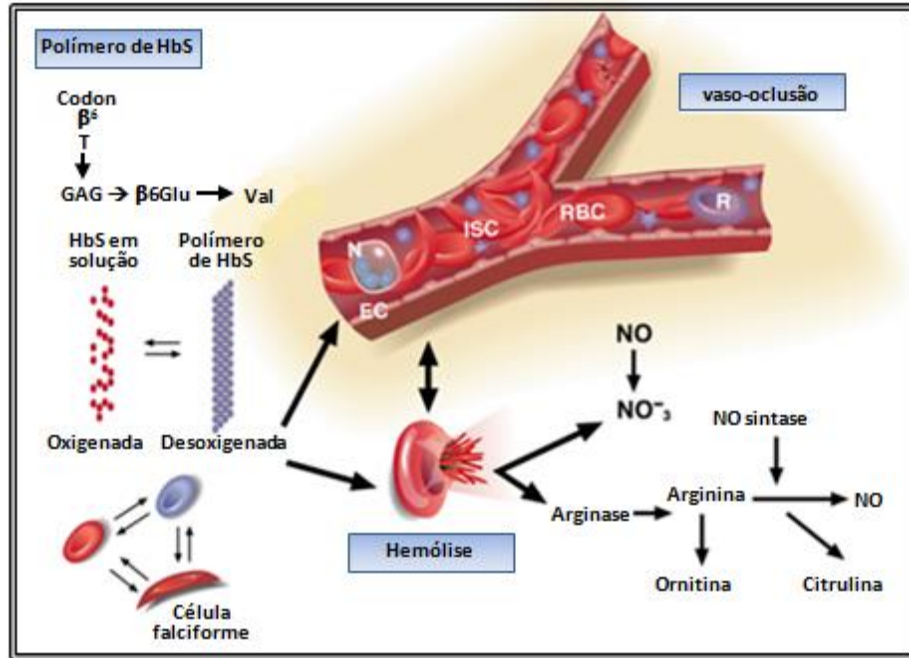


Figura 2: Mecanismo fisiopatológico da anemia falciforme (adaptada de Steinberg, 2008).

Além da capacidade de polimerização da HbS, as alterações nos mecanismos de transporte de íons das células vermelhas contribuem com a fisiopatologia da AF. A homeostasia catiônica é prejudicada nas células falciformes, principalmente, pela capacidade reduzida destas células para manter o seu gradiente normal de K^+ , a qual é mediada pela ativação de canais transportadores de íons, tais como o canal de Gardos e o sistema de co-transporte do K-Cl (Brugnara, 2003; Steinberg, 2008; Sonati & Costa, 2008). Este último, quando ativado, permite que o K^+ e o Cl^- deixem a célula, seguidos pela água, o que resulta em desidratação celular. Esta atividade está anormalmente aumentada na AF, o que leva a uma maior concentração intracelular de HbS e favorece sua polimerização. O canal de Gardos é um canal de efluxo de K^+ ativado pelo aumento intracelular de Ca^{++} decorrente da desoxigenação e da falcização das hemácias. Assim, como ocorre no sistema de K-Cl, a saída de K^+ resulta no efluxo de água, desidratação celular e aumento da concentração interna de HbS (Sonati & Costa, 2008).

A AF tem sido caracterizada como um estado inflamatório crônico com ativação anormal do endotélio, resultante de vários fatores que se associam. A vaso-oclusão é a principal causa de morbimortalidade na AF; essa obstrução de vasos sanguíneos, seguida por isquemia ou infarto em vários tecidos, leva, em última instância, à lesão progressiva dos órgãos-alvo (Johnson & Telen, 2008). O entendimento desse processo tem evoluído ao longo de várias décadas. Inicialmente, foi pensado que a polimerização da HbS resultando em células falcizadas, que mecanicamente bloqueavam os vasos de pequeno calibre, respondia completamente pelo processo. Entretanto, mais tarde foi reconhecido que estes eritrócitos lesados, por si só, não eram suficientes para produzir a vaso-oclusão em vasos maiores, que pode ser observada tanto em seres humanos quanto em modelos animais. Assim, foi postulado que outros fatores exercem papel relevante nesse processo, incluindo a inflamação crônica vascular, a adesão dos leucócitos, a ativação e agregação das plaquetas, a ativação da coagulação, o dano endotelial e a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (Chiang & Frenette, 2005). Dessa forma, uma visão ampliada da patogênese que envolva esses fatores é crucial na fisiopatologia, no desenvolvimento e na heterogeneidade da doença (Kutlar, 2005).

1.5.1 Estado inflamatório crônico e a ativação da célula endotelial

As células endoteliais participam na manutenção da hemostasia e produzem NO, gás vasodilatador que regula o tônus vascular, além de ser importante inibidor da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais e da ativação dos leucócitos (Sonati & Costa, 2008). A Hb livre e a arginase, enzima que consome o substrato L-arginina utilizado para a produção de NO, são liberadas durante a hemólise crônica dos eritrócitos falciformes. O fenômeno da vasoconstrição é resultante do sequestro deste gás e consumo

do substrato e, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo, favorece o processo de falcização dos eritrócitos falciformes, aumenta a ativação plaquetária e a expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais, comprometendo, assim, a integridade do endotélio vascular e promovendo a adesão dos eritrócitos e dos leucócitos (Conran et al., 2003; Brittain & Parise, 2007; Zago & Pinto, 2007; Conran & Costa, 2009).

A ativação endotelial ocorre na presença de mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e proteína C reativa (CRP) (Conran & Costa, 2009). A Hb livre danifica e também ativa as células endoteliais. A hemólise e as espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuem para o consumo do NO e, conseqüentemente, podem induzir à produção de endotelina-1 e à expressão de moléculas de adesão (Conran & Costa, 2009). Atualmente, é amplamente aceito que os leucócitos, encontrados em contagem elevada em vários pacientes com AF, desempenham um papel fundamental na fisiopatologia da doença, aderindo ao endotélio vascular e participando do estresse oxidativo e dos mecanismos de inflamação (Brittain & Parise, 2007). Além das interações entre monócitos e endotélio, que desempenham papel importante na modulação da vasculopatia na AF e que ocorrerem em resposta à lesão no vaso, outras interações de diferentes células sanguíneas e fatores plasmáticos com as células endoteliais produzem inflamação, estresse oxidativo e ativação endotelial (Zennadi et al., 2008). A adesão dos monócitos às células endoteliais resulta na indução de genes envolvidos na sua migração transendotelial e diferenciação em macrófagos (Lim et al., 1998; Zennadi et al., 2008). Os primeiros genes induzidos nesse processo são aqueles para as moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. Zhao et al. demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β induzem a expressão de E-selectina e VCAM-1 (molécula de adesão da célula

vascular-1), facilitando a adesão de monócitos às Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC) (Zhao et al., 2003). O estado pró-adesivo das células endoteliais durante sua exposição a componentes celulares do sangue pode proporcionar um ambiente favorável para vaso-oclusão na AF, no qual a inflamação e o dano endotelial exercem papéis significativos na fisiopatologia (Safaya et al., 2012).

A ativação da via de sinalização NF- κ B é induzida no endotélio ativado, conduzindo à regulação positiva da expressão da molécula de adesão de superfície e à produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e leucotrienos, fatores vasoconstritores e fatores pró-coagulantes, tais como o fator de von Willebrand (FvW), fator de ativação de plaquetas (PAF) e o fator tecidual (TF). Muitas dessas moléculas perpetuam a ativação endotelial, levando ao estado inflamatório crônico que é característico da AF (Conran & Costa, 2009).

Os leucócitos na AF interagem não somente com o endotélio, mas também com plaquetas circulantes e eritrócitos falciformes, sendo identificados como locais de captura e fixação de eritrócitos na vasculatura, sugerindo papéis diretos e indiretos no processo da vaso-oclusão (Brittain & Parise, 2007). Já os eritrócitos falciformes, ao interagirem com as células endoteliais, aumentam a expressão das moléculas ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), VCAM-1 e a endotelina-1 (Safaya et al., 2012). Ensaios em modelo animal (Hb SS) demonstraram que, após um estímulo inflamatório, os leucócitos são recrutados para o endotélio ativado das vênulas pós-capilares e, subsequentemente, formam interações adesivas com os eritrócitos circulantes, conduzindo a redução do fluxo sanguíneo e, eventualmente, vaso-oclusão (Frenette, 2002; Turhan et al., 2002). Por outro lado, tem sido observado que os eritrócitos falcizados podem recrutar os leucócitos para a parede do vaso

(Zennadi et al., 2008) e ativar a cascata de coagulação, pela exposição da fosfatidilserina na sua superfície, promovendo ainda mais inflamação através da via da geração de trombina e exposição do fator tecidual (Yasin et al., 2003).

Outro aspecto do processo vaso-oclusivo é abordado por estudos que identificaram níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias alterados em pacientes com AF, durante a crise ou no estado estável da doença (Pathare et al., 2004; Brittain & Parise, 2007). A primeira defesa do organismo ao dano tecidual é a resposta inflamatória aguda, a qual representa um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis na tentativa de remover o estímulo e realizar o reparo tecidual completo. Entretanto, a persistência do estímulo nocivo conduz à inflamação crônica, caracterizada por mudanças progressivas nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido lesado (Souza et al., 2010).

A oclusão da microcirculação, infecções e hemólise são fatores importantes que estimulam a produção de citocinas e proteínas de fase aguda (Pathare et al., 2004). Além disso, o endotélio ativado produz citocinas e quimiocinas, incluindo IL-1 β , PAF, IL-6 e IL-8, os quais contribuem para a ativação pancelular que resulta em altos níveis circulantes de numerosas moléculas inflamatórias encontradas nos indivíduos com AF, incluindo TNF- α , fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-3 e fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (Gonçalves et al., 2001; Conran & Costa, 2009; Lanaro et al., 2009). As citocinas, TNF- α e IL-1 β , como mencionado anteriormente, são potentes ativadores do endotélio criando um ciclo vicioso que leva à perpetuação da produção de mediador inflamatório, adesão celular a parede vascular e, eventualmente, a inflamação crônica (Conran & Costa, 2009).

Outro mediador inflamatório que pode fornecer contribuição importante para a ativação endotelial é a CRP, a qual tem sido relatada em níveis aumentados entre pacientes em estado estável da doença, bem como durante crises álgicas vaso-oclusivas (Archer et al., 2008). Essa proteína de fase aguda é produzida pelos hepatócitos em resposta ao aumento dos níveis de IL-6, e induz a processos inflamatórios, bem como a lesão tecidual, estimula a produção de quimiocinas e citocinas, diminui a expressão e a atividade da NO sintase, e aumenta a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (Schnog et al., 2004; Makis et al., 2006; Conran & Costa, 2009).

1.5.2 Papel das moléculas de adesão

As moléculas de adesão celular são glicoproteínas expressas na superfície celular, as quais modulam o contato entre células sanguíneas ou entre células e o endotélio vascular. Além disso, funcionam como moléculas sinalizadoras e têm participação essencial na regulação da inflamação e resposta imune, por mediar o recrutamento e a migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação (Gomes et al., 2009; Granger & Senchenkova, 2010).

O endotélio vascular desempenha papel crucial na vaso-oclusão e na isquemia de órgãos-alvo por meio de vários mecanismos, os quais incluem a regulação da hemostasia e do tônus vascular, a adesão de hemácias e leucócitos, e a lesão provocada pela isquemia-reperfusão (Belcher et al., 2000). Vários estudos sugerem que o endotélio vascular encontra-se frequentemente lesado na AF, principalmente pela presença anormal de moléculas de adesão de células endoteliais circulantes, tais como a ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina no plasma dos pacientes (Kaul et al., 2009), e o aumento do número das células endoteliais circulantes no sangue dos pacientes com crise álgica aguda (Solovey et al.,

1997; Belcher et al., 2000; Strijbos et al., 2009). As moléculas expressas na superfície das células endoteliais ativadas incluem ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina e o fator tecidual (Belcher et al., 2000; Johnson & Telen, 2008). A L-selectina é uma molécula de adesão constitutivamente expressa em uma variedade ampla de leucócitos, desempenhando papel importante na migração dessas células para os locais de inflamação (Granger & Senchenkova, 2010). Essa selectina medeia a captura e o rolamento dos leucócitos sobre as células endoteliais, após interação com as selectinas P e E, expressas no endotélio (Conran et al., 2003; Granger & Senchenkova, 2010).

As moléculas de adesão das células endoteliais desempenham papel fisiológico vital no recrutamento e na ligação das células inflamatórias ao endotélio vascular, particularmente em vênulas (Kato et al., 2005). Várias pesquisas apontam que, além do grau de polimerização da HbS, a vaso-occlusão pode ser dependente das interações entre eritrócitos e reticulócitos falciformes, leucócitos e células endoteliais por meio das moléculas de adesão, contribuindo de maneira significativa com a fisiopatologia da doença (Setty & Stuart, 1996; Frenette, 2004; Hebbel et al., 2004; Wood et al., 2004; Kaul et al., 2009). A expressão dessas moléculas de adesão celular está sob a influência de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β (Kato et al., 2005; Monchanin et al., 2008). Existem também algumas evidências de que os eritrócitos falcizados ativam ou danificam as células endoteliais (Johnson & Telen, 2008). Em 2001, Brown et al. demonstraram o aumento da expressão de VCAM-1, E-selectina e ICAM-1 em cultura de células endoteliais expostas a eritrócitos falcizados. Danos na membrana do eritrócito falciforme também levam à exposição de fosfatidilserina, que é normalmente restrita à superfície interna da bicamada lipídica da membrana. Esta exposição de fosfatidilserina também contribui para a

aderência dessas células ao endotélio (Chiang & Frenette, 2005; Johnson & Telen, 2008; Setty & Betal, 2008). Fundamentado em alguns estudos, acredita-se que níveis elevados de moléculas de adesão solúveis no plasma de pacientes com AF ocorram secundariamente ao aumento do estresse inflamatório sistêmico (Kato et al., 2005).

A expressão de moléculas de adesão também é modulada pelo NO endotelial produzido a partir da NO sintase, uma vez que a inibição dessa enzima durante a estimulação com TNF- α e IL-1 β aumenta significativamente a expressão gênica de VCAM-1 (De Caterina et al., 1995). Assim, níveis elevados de sVCAM-1 no plasma refletem uma disfunção endotelial que é observada na biologia vascular da AF. Vários relatos têm destacado que os níveis elevados de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis estão associados com a diminuição da biodisponibilidade do NO e o aumento da taxa hemolítica em pacientes com AF (Setty & Stuart, 1996; Gladwin et al., 2003). Assim, a ativação excessiva do endotélio e a vasoconstrição resultante do consumo do NO podem contribuir para a instabilidade vascular observada nos pacientes com AF (Reiter & Gladwin, 2003; Nath et al., 2004). Estas observações sugerem que as moléculas de adesão solúveis são potenciais marcadores de disfunção endotelial, caracterizada por ativação do endotélio e biodisponibilidade insuficiente do NO derivado do endotélio (Kato et al., 2005).

Níveis circulantes aumentados de VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, a laminina, e trombospondina solúveis foram observados em pacientes com AF fora de crise. Durante episódios vaso-oclusivos, os pacientes apresentam aumento do número de células endoteliais ativadas que expressam ICAM-1, VCAM-1, P-selectina e E-selectina (Solovey et al., 1997; Brown et al., 2001). Já as moléculas E-selectina e ICAM-1 são consideradas importantes para a promoção da resposta inflamatória observada após isquemia e

reperusão, o que poderia ser consequência da vaso-oclusão (Brown et al., 2001). As interações célula-célula e célula-endotélio contribuem para a vaso-oclusão e têm sido destacadas como alvos em potencial para abordagens farmacológicas com o intuito de atenuar a gravidade da AF (Finnegan et al., 2007) Até o momento, a hidroxiureia continua sendo a droga que induz a diminuição na frequência de episódios vaso-oclusivos e proporciona benefícios clínicos para um número expressivo de pacientes com AF (Johnson & Telen, 2008).

1.5.3 Hipercoagulabilidade na AF

A vaso-oclusão na AF é um processo complexo e multifatorial e, o papel da coagulação intravascular na patogênese da crise vaso-oclusiva ainda não está completamente compreendido (Ahmed et al., 2004; van Beers et al., 2009). Os pacientes com AF, durante períodos clinicamente estáveis, normalmente apresentam aumento da ativação das plaquetas, da geração de trombina e da fibrinólise. Entretanto, observa-se amplificação destas atividades trombogênicas durante períodos de crise, o que caracteriza o estado de hipercoagulabilidade, resultante da coagulação crônica e da ativação endotelial (Tomer et al., 2001; van Beers et al., 2009). Embora a hipercoagulabilidade seja considerada multifatorial, torna-se cada vez mais claro que a hemólise crônica e o grau de exposição de fosfatidilserina em eritrócitos desempenham papel crucial neste processo (Setty et al., 2001; van Beers et al., 2009). Outros pesquisadores relataram que as micropartículas, pequenas vesículas de membrana liberadas por brotamento a partir de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e células endoteliais, após ativação ou durante a apoptose, também podem contribuir para o estado de hipercoagulabilidade na AF (Diamant et al., 2004).

Em eventos trombóticos, comumente observados na AF, incluindo acidente vascular encefálico (AVE), necrose avascular e embolia pulmonar, observam-se que vários parâmetros hemostáticos estão alterados, tais como: as plaquetas, que estão anormalmente ativadas e em número aumentado; os eritrócitos, que são pró-coagulantes devido à exposição da fosfatidilserina; os níveis do FvW e do fator VIII (FVIII), que são elevados e, finalmente, a geração de trombina crônica, com níveis elevados de Dímeros-D, complexo trombina-antitrombina (TAT) e outros marcadores (Telen, 2007). As plaquetas, estimuladas pela presença de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e GM-CSF, liberam multímeros de von Willebrand que favorecem as ligações entre plaquetas, endotélio e o eritrócito falciforme (Graido-Gonzales et al., 1998).

Os Dímeros-D são produtos específicos de degradação da fibrina, sendo portanto, utilizados como marcadores plasmáticos de fibrinólise. Seu nível plasmático tem sido utilizado como indicativo, de maneira indireta, da ocorrência de trombose e/ou coagulação intravascular. (Anderson & Wells, 2000). Na literatura, há relatos que pacientes com AF têm níveis elevados de Dímeros-D, sendo esses níveis correlacionados com a ocorrência de complicações vaso-oclusivas (Setty et al., 2001; Ahmed et al., 2004).

O FvW é outro elemento com participação relevante nos mecanismos relacionados ao estado de hipercoagulabilidade encontrado na AF; corresponde a uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular, sintetizada pelas células endoteliais e megacariócitos. No plasma, os multímeros do FvW são clivados por uma protease denominada ADAMTS13 (*a disintegrin-like and metalloprotease with trombospondin type 1 motifs*) que limita a formação do trombo plaquetário. O FvW tem duas funções principais: ligar e transportar o fator VIII, protegendo-o da degradação proteolítica no plasma; e ligar-se ao

colágeno presente no subendotélio e nas plaquetas, promovendo adesão e agregação plaquetária em locais de dano vascular, sendo utilizado como marcador de disfunção endotelial (Zhou et al., 2009; Chen et al., 2011).

A hemólise intravascular é um componente importante da AF e, a Hb livre no plasma tem efeitos deletérios sobre a vasculatura, provocando o consumo do NO e promovendo a gênese de vários eventos. A redução da biodisponibilidade do NO, gás que regula a ativação das plaquetas, conduz à agregação das mesmas e a formação de coágulos vasculares. Estudos *in vitro* demonstraram que a hipóxia é forte agonista para a liberação endotelial do FvW (Krishnan, 2008) e, recentemente, um mecanismo adicional foi postulado, pelo qual a hemólise intravascular aumentada conduz a um estado trombótico, por aumentar a atividade do FvW na AF. Nesse processo, a Hb livre liga-se diretamente ao FvW, no local do sítio proteolítico da metaloprotease, ADAMTS13, bloqueando, assim, a clivagem do FvW *in vitro*. Dessa forma, o aumento da Hb livre está associado com altos níveis de multímeros do FvW hiperativos no plasma de pacientes com AF (Zhou et al., 2009). Em outro estudo, Zhou et al. observaram que a sub-população de multímeros do FvW ligados a Hb livre é hiperativa, e existe em maior quantidade no plasma de pacientes com AF do que em controles normais. Estes resultados sugerem que a Hb livre no plasma possa ser capaz de acumular multímeros do FvW hiperativos *in vivo* que, por sua vez, podem mediar as complicações trombóticas e vaso-oclusivas observadas em pacientes com AF (Zhou et al., 2012).

1.5.4 Fenômenos vaso-oclusivos

Os neutrófilos, também ativados pelas citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e GM-CSF, são recrutados para o sítio inflamatório, aumentando a

produção de peróxidos e expõem maior quantidade de moléculas de adesão em sua superfície, facilitando, assim, a adesão ao endotélio, a outros neutrófilos, às plaquetas e aos eritrócitos falciformes, culminando com fenômenos vaso-oclusivos frequentemente observados na AF (McIntyre et al., 2003).

Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem, principalmente, em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão do oxigênio é baixa, ou ainda, naqueles órgãos onde há suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. A hipóxia decorrente da obstrução vascular leva a infartos teciduais, e proporciona crises de dor ou danos teciduais crônicos (Lacie & Elion, 1999).

A forma anormal do eritrócito falciforme, aliada à sua rigidez acentuada, viscosidade aumentada e tendência a aderir às células do endotélio, favorece a ocorrência de dois mecanismos patológicos principais: hemólise e vaso-oclusão. A anemia, icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia, alterações ósseas e úlcera de perna podem ser atribuídas à hemólise. Os eventos vaso-oclusivos podem gerar, de acordo com o local envolvido, dor abdominal, necrose asséptica da cabeça do fêmur, priapismo, artralgia, dactilite, hipostenúria, hematúria, AVE e lesões na retina. O fenômeno da vaso-oclusão pode levar à destruição progressiva do baço e conseqüentemente à auto-esplenectomia, sendo responsável pela suscetibilidade aumentada a infecções graves, que estão entre as principais causas de morte em todas as idades nesse grupo de pacientes (Serjeant, 1997; Stuart & Nagel, 2004).

1.6 MODULADORES GENÉTICOS DA AF

Desde a primeira descrição da diferença química entre as Hbs de células normais e de células falcizadas, há pouco mais de 60 anos, a AF tornou-se uma das doenças

monogênicas humanas melhor caracterizadas (Fertrin & Costa, 2010). Uma das propriedades marcantes da doença é a variabilidade de suas manifestações clínicas e embora muitos esforços da comunidade científica sejam empregados na tentativa de elucidar o papel dos vários fatores responsáveis, as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas (Lette et al., 2008), variando de formas quase assintomáticas até clinicamente graves, responsáveis por alta mortalidade na infância (Serjeant, 1997; Higgs & Wood, 2008). Na AF, vários polimorfismos estão associados não apenas com o grau de anemia, mas também com a ocorrência de dor, AVE, úlceras de perna, hipertensão pulmonar, osteonecrose, complicações hepatobiliares, priapismo, entre outras manifestações clínicas (Fertrin & Costa, 2010). Dessa forma, os fatores genéticos são de grande importância na modulação do quadro clínico dessa doença, 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 (Higgs & Wood 2008, Lette et al., 2008).

Além dos moduladores clássicos da AF, outros polimorfismos genéticos podem explicar a variabilidade clínica observada nos pacientes e podem tornar-se alvos para o desenvolvimento de novas terapias. É possível citar, como exemplos, polimorfismos no gene *Klotho* e em vários genes da via de sinalização TGF- β /BMP, os quais parecem estar relacionados ao desenvolvimento de hipertensão pulmonar, priapismo, úlceras de perna e AVE, enquanto que o polimorfismo na região promotora do gene *UGT1A* (rs8175347) e a mutação C677T no gene *MTHFR* (rs1801133) podem aumentar o risco da ocorrência de colelitíase e osteonecrose, respectivamente (Fertrin & Costa, 2010). Outros polimorfismos se destacam por influenciar os níveis de HbF, como nos genes *KLF1*, *BCL11A* e *HBSIL-*

MYB genes que apresentam papel relevante na eritropoiese e no *switching* da HbF para Hb adulta (Menzel et al., 2007; Sankaran et al., 2008; Sankaran et al., 2009; Satta et al., 2011).

O entendimento do mecanismo de ação de outros candidatos a moduladores, como os componentes inflamatórios, vasculares e hemolíticos nas DF, pode levar a novas descobertas e abordagens terapêuticas (Steinberg & Adewoye, 2006). Mais recentemente, o polimorfismo da haptoglobina (Hp) tem sido investigado como um possível modulador genético das DF (Hughes et al., 2005; Bora et al., 2008; Santos et al., 2011).

1.7 CANDIDATOS A MODULADORES DA GRAVIDADE CLÍNICA DA AF

1.7.1 Haptoglobinas humanas

A Hp é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente nos hepatócitos, cuja produção é induzida pela secreção de IL-6, IL-1 β e TNF- α (Sandrzadeh & Bozorgmehr, 2004; Van Vlierberghe et al., 2004).

O processo de hemólise intravascular, com a liberação da Hb contida nos eritrócitos, parece ser um mediador importante de doenças vasculares (Azarov et al., 2008). A toxicidade e a natureza inflamatória da Hb livre resultam do maior consumo de NO que ela promove e consequente acúmulo de radicais hidroxilas e ROS nos vasos. O primeiro mecanismo de defesa do organismo contra os efeitos deletérios da Hb livre é realizado pela Hp, cuja função primordial é ligar-se à Hb livre no plasma, impedindo a excreção renal de ferro e protegendo os vasos de seus efeitos oxidativos (Langlois & Delanghe, 1996; Melamed-Frank et al., 2001). Essa proteína forma um complexo solúvel com a Hb (Hp-Hb) cuja ligação constitui a mais forte interação não-covalente conhecida entre proteínas plasmáticas de transporte, caracterizada por afinidade e estabilidade extremamente elevadas

(Langlois & Delanghe, 1996; Van Vlierberghe et al., 2004). Subsequentemente à ligação, esse complexo é rapidamente removido da circulação, principalmente pelos hepatócitos (90%) e macrófagos/monócitos teciduais (10%) (Van Vlierberghe et al., 2004). O receptor para o complexo Hp-Hb nos macrófagos/monócitos teciduais foi identificado e denominado de CD163 (Kristiansen et al., 2001), cuja expressão é marcadamente induzida pela diferenciação dos monócitos em macrófagos, sendo considerado um marcador de diferenciação desse tipo celular, porém nos hepatócitos, o receptor específico ainda permanece sem caracterização. Após a endocitose, o complexo Hp-Hb é catabolizado nos lisossomos; a Hp não é reciclada, mas como consequência do processo, o grupo heme é degradado pela ação da enzima heme-oxigenase (HO) e o ferro é liberado e utilizado para síntese de novas proteínas, como a Hb, além da liberação da biliverdina, que posteriormente é convertida em bilirrubina (Levy, 2003; Van Vlierberghe et al., 2004). A IL-6 desempenha um papel regulatório relevante, pois além de estimular a produção de Hp, aumenta a expressão dos receptores CD163 nos macrófagos e eleva a eficiência da degradação do grupo heme da Hb (Dennis, 2001) (Figura 3). Na AF, a destruição dos eritrócitos ocorre, predominantemente, no espaço extravascular, mas ainda assim, parte da lise acontece no compartimento intravascular, evidenciada pelos níveis séricos reduzidos de Hp observados nessa doença (Hillman & Finch, 1992).

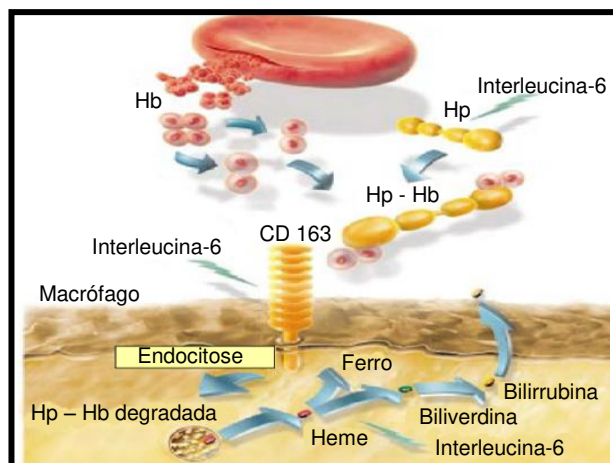


Figura 3: Representação esquemática da endocitose do complexo Hp-Hb pelos macrófagos (adaptada de Dennis, 2001).

A molécula da Hp consiste de duas cadeias polipeptídicas diferentes, cadeias α e β , as quais são codificadas por dois alelos autossômicos codominantes – HP1 e HP2 – mapeados no braço longo do cromossomo 16 (16q22) (Langlois & Delanghe, 1996). Em ambos os alelos, os *loci* que correspondem a essas cadeias são ligados, de modo que um único mRNA é sintetizado, gerando uma cadeia polipeptídica que, quando clivada, formam as duas cadeias distintas, α e β (Asleh & Levy, 2005).

As cadeias β consistem de 245 aminoácidos (aa) e não são polimórficas. O polimorfismo da Hp é consequência das variações nas cadeias α que resultam das diferenças entre a cadeia α_1 (83 aa), codificada pelo alelo HP1, e α_2 (142 aa), codificada pelo alelo HP2 (Yano et al., 1998). A cadeia α_1 é ainda subdividida em α_1S (“slow”) e α_1F (“fast”), de acordo com sua mobilidade eletroforética decorrente da troca de dois aminoácidos (Langlois & Delanghe, 1996).

O alelo HP1 se subdivide em HP1S e HP1F; estes diferem entre si por substituições de bases nos códons 52 e 53, localizados no éxon 4 (Carter & Worwood, 2007). Como consequência, as cadeias resultantes distinguem-se nos aminoácidos nas posições 52 e 53,

sendo asparagina e ácido glutâmico na cadeia α 1S e ácido aspártico e lisina na cadeia α 1F (Yano et al., 1998). O alelo HP2 é originário de uma duplicação intragênica parcial do alelo HP1, ocorrida através de um *crossing over* desigual entre um alelo HP1F e um alelo HP1S (Asleh & Levy, 2005). Os resíduos homólogos contidos em cada sequência específica desses alelos gênicos são repetidos *in tandem* no alelo HP2, ou seja, enquanto os alelos HP1 apresentam 5 éxons, os alelos HP2 possuem 7 éxons, sendo os éxons 5, 6 e 7 do HP2 correspondentes aos éxons 3, 4 e 5 do HP1S (Figura 4). O último éxon de cada alelo HP (éxon 5 no HP1 e éxon 7 no HP2) responde pela síntese das cadeias β , enquanto que os demais são responsáveis pela produção das cadeias α . As cadeias α 2, sintetizadas pelo alelo HP2, são por essa razão, quase duas vezes mais longas que as cadeias α 1 (Yano et al., 1998).

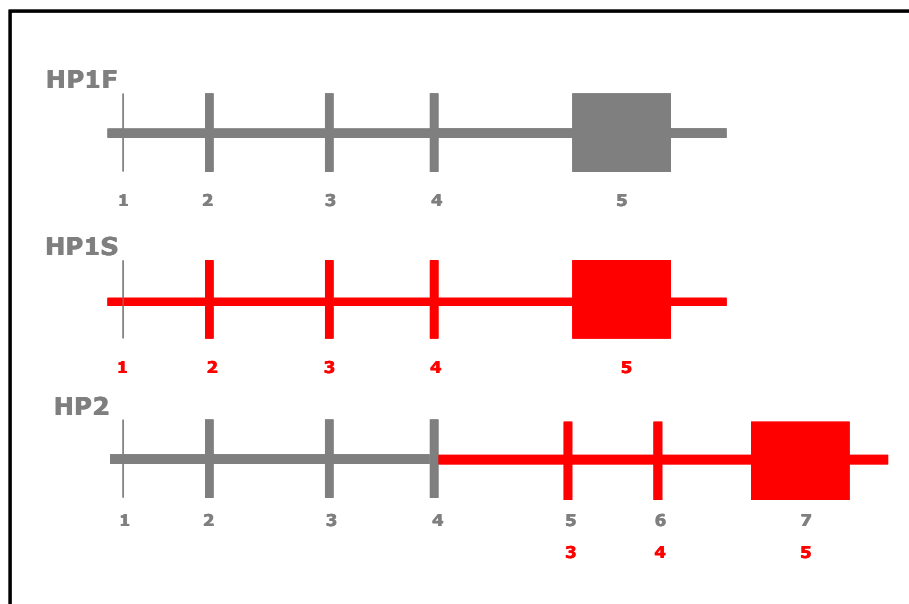


Figura 4: Representação esquemática da estrutura dos genes da Hb. Os *boxes* indicam os éxons (adaptada de Yano et al., 1998).

A combinação entre esses alelos resulta em seis diferentes genótipos/fenótipos: Hp1S-1S, Hp1F-1S, Hp1F-1F, Hp2-1S, Hp2-1F e Hp2-2, sendo considerados os três genótipos/fenótipos principais (Hp1-1, Hp2-1, e Hp2-2), que correspondem a proteínas com características bioquímicas/biofísicas e eficiências funcionais bastante diferenciadas, relacionadas com suscetibilidade e evolução clínica em várias doenças (Langlois & Delanghe, 1996; Melamed-Frank et al., 2001; Sadrzadeh & Bozorgmehr, 2004; Asleh & Levy, 2005; Wobeto et al., 2008). O subtipo Hp1-1 corresponde à molécula de menor tamanho, sendo encontrada como dímero, com peso molecular de aproximadamente 86 kDa. Em contraste, Hp2-2 é encontrada como polímero cíclico, apresentando o maior peso molecular - 170 a 900 kDa, enquanto a Hp2-1 consiste de um polímero linear e possui peso molecular intermediário - 90 a 300 kDa (Figura 5) (Melamed-Frank et al., 2001). Ensaios, *in vitro*, demonstraram que a proteína Hp1-1 confere maior proteção contra danos oxidativos que a proteína Hp2-2 (Koda et al., 1998). Como os três fenótipos principais apresentam a mesma capacidade de ligação à Hb (Melamed-Frank et al., 2001), variações na sua propriedade de liberação do heme, provavelmente, resultam das diferenças no tamanho dessas proteínas. Dessa forma, a proteína Hp2-2 apresenta remoção mais lenta do ferro para o espaço extravascular, por ser molécula mais complexa, conseqüentemente, a Hb permanece por mais tempo no vaso levando ao aumento do estresse oxidativo (Melamed-Frank et al., 2001). Esses dados são consistentes com os achados anteriores, que mostraram que o consumo *in vitro* de vitamina C no plasma de indivíduos com fenótipo Hp2-2 foi mais rápido do que no plasma daqueles com fenótipo Hp1-1 (Langlois et al., 1997). A superprodução de ROS, por sua vez, pode também perturbar a homeostase do NO e está relacionada ao agravamento dos sintomas de muitas doenças, incluindo a AF (Wood et al., 2008).

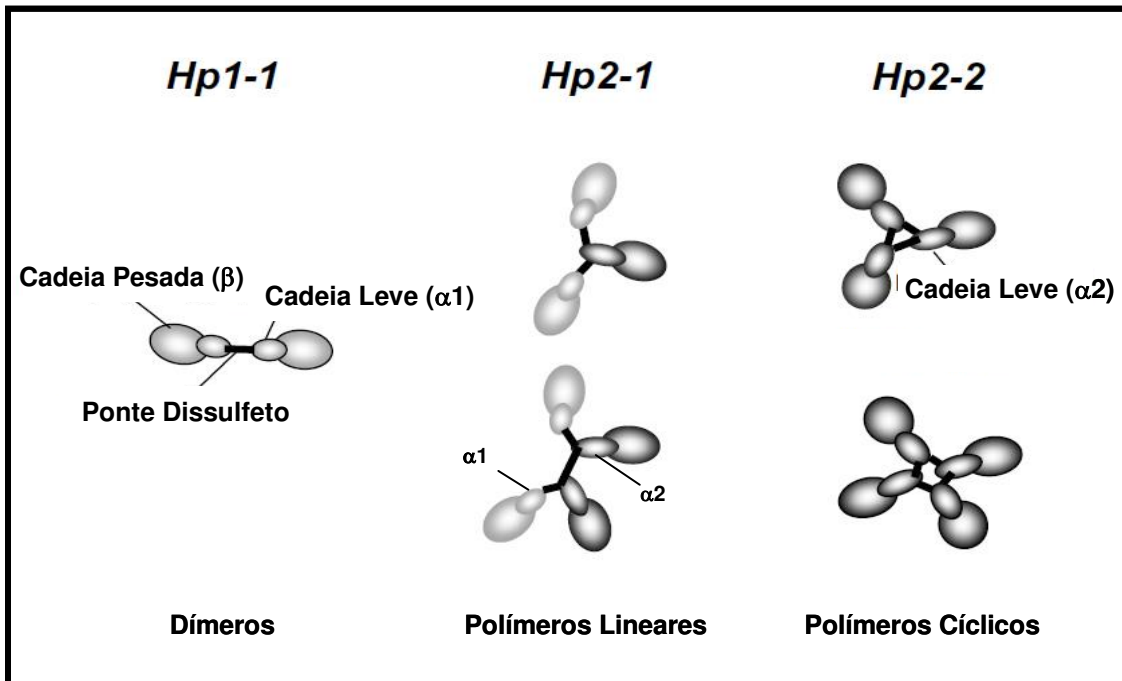


Figura 5: Representação esquemática das diferentes estruturas proteicas correspondentes aos três fenótipos da Hp (adaptada de Asleh & Levy, 2005).

Uma consequência deletéria da presença da Hb livre liberada pelos eritrócitos é a intensificação do consumo do NO (Azarov et al., 2008) e os genótipos da Hp têm sido relacionados às doenças nas quais o NO parece ter papel relevante (Levy, 2003; Van Vlierberghe et al., 2004; Hughes et al., 2005). Diferenças na propriedade de consumo do NO, dependentes dos genótipos da Hp, podem estar associadas à proporção de captura do complexo Hp-Hb pelos macrófagos, sendo que os complexos com a proteína Hp1 são retirados do vaso de 2 a 3 vezes mais rapidamente que os complexos com a proteína Hp2 (Azarov et al., 2008). Em 2008, Azarov et al., através de cálculos computacionais, determinaram que a diferença de duas vezes na razão da remoção do complexo Hp-Hb afetaria de maneira significativa a biodisponibilidade do NO. Dessa forma, os genótipos da Hp poderiam contribuir para o desenvolvimento de complicações em algumas dessas doenças.

Além da capacidade antioxidativa, a Hp é uma proteína de fase aguda positiva, com propriedades imunomodulatórias, podendo inibir ou estimular a resposta imune, e promotoras de angiogênese (Langlois & Delanghe, 1996; Melamed-Frank et al., 2001; Van Vlierberghe et al., 2004; Wobeto et al., 2008). Diferentes subtipos de linfócitos, conhecidos como células Th1 e Th2, são responsáveis por induzir e regular a resposta imune celular e humoral, respectivamente. As células Th1 produzem IL-2 e IFN- γ e induzem uma forte resposta IgG, favorecendo, dessa forma, a resposta imune celular, enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e aumentam a produção de IgE, mediando resposta predominantemente humoral e eosinofílica. Tem sido demonstrado que a Hp atua de maneira relevante na modulação do equilíbrio entre os linfócitos Th1 e Th2 (Th1/Th2), pela promoção de resposta celular predominantemente Th1 (Arredouani et al., 2003). Essas células são mais efetivas na proteção contra infecção envolvendo parasitas intracelulares e inibição da liberação das citocinas Th2, responsáveis pela defesa contra micro-organismos extracelulares. A Hp parece seletivamente modular a resposta inflamatória pela propriedade de suprimir a síntese do TNF- α , IL-10 e IL-12 pelos monócitos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) (Wobeto et al., 2008). Em 2007, Guetta et al. mostraram que o complexo Hp1-1-Hb induz muito mais a produção de IL-6 e IL-10 do que o complexo Hp2-2-Hb, e que a liberação dessas citocinas depende da ligação desses complexos aos receptores CD163 de macrófagos e da atividade da caseína Kinase II (CKII). O fenótipo da Hp pode, assim, modular o equilíbrio entre as citocinas inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2) produzidas pelo macrófagos expostos à Hb livre, podendo contribuir para as diferenças interindividuais na resposta inflamatória (Guetta et al., 2007). A Figura 6 representa um modelo para o papel da Hp nos processos inflamatórios. Em indivíduos com o fenótipo Hp1-1, a produção de ROS é significativamente reduzida pela Hp, devido à sua

potente capacidade antioxidativa e anti-inflamatória, desencadeando uma resposta dominante do tipo Th2, responsável pelo reparo e cura. Entretanto, em indivíduos Hp2-2, a fraca repressão de ROS permitiria a persistência de estímulos inflamatórios, levando à resposta Th1 e aumento do estresse oxidativo. A Hb é um modulador nesse modelo, pois quando ligada à Hp reduz a produção de ROS e esgota a Hp disponível na circulação. Este modelo pode explicar a influência dos fenótipos da Hp nos efeitos e na progressão de doenças parasitárias, doenças infecciosas e não infecciosas (Guetta, 2007; Quaye, 2008).

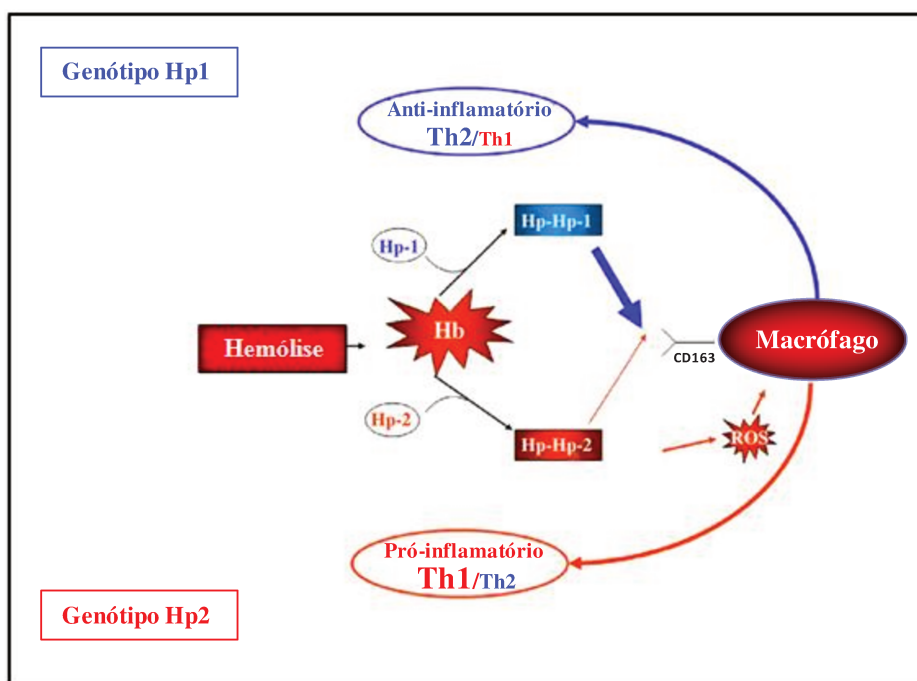


Figura 6: Modelo do papel do genótipo da Hp na determinação da resposta inflamatória (adaptada de Guetta et al., 2007).

A AF tem sido caracterizada como estado inflamatório crônico e o papel da hemólise, da Hb livre, do consumo de NO e de vários aspectos inflamatórios têm conduzido a novos estudos para melhor entendimento da fisiopatologia dessa doença.

A identificação das diferenças funcionais resultantes do polimorfismo da Hp tem levado vários pesquisadores a investigar a importância dessa proteína na homeostase do

ferro e na suscetibilidade e evolução de diversas doenças humanas (Van Vlierberghe et al., 2004). Estudos clínicos têm demonstrado que o polimorfismo da Hp pode ter papel importante sobre suas propriedades antioxidativas. Em pacientes diabéticos, por exemplo, o fenótipo Hp2-2 foi considerado fator de risco para complicações micro e macrovasculares (Melamed-Frank et al., 2001).

A associação entre a Hp e as DF tem sido pouco estudada, e em casuísticas pouco representativas. Em 1987, Ostrowski et al. observaram maior frequência do fenótipo Hp1-1 em pacientes SS e S/ β -talassêmicos (n = 18). No ano seguinte, o grupo encontrou a mesma associação analisando indivíduos SC (n = 10) (Ostrowski et al., 1988). Outro grupo de pesquisa observou a baixa representatividade do genótipo Hp2-2 em pacientes adultos com DF quando comparados aos pacientes pediátricos, sugerindo uma desvantagem para pacientes com esse genótipo (Hughes et al., 2005). Posteriormente, o mesmo grupo avaliou, *in vitro*, a liberação de citocinas pelas células mononucleares obtidas de controle normal e de paciente com DF, quando incubadas com diferentes complexos Hp-Hb e concluiu que a produção de citocinas é predominantemente relacionada ao tipo de Hp, e não ao tipo de Hb ligada ao complexo, demonstrando que o genótipo Hp2-2 corresponde a uma resposta inflamatória mais acentuada (Bora et al., 2008).

Em estudo prévio realizado por nosso grupo, os genótipos da Hp foram identificados em 775 pacientes afro-brasileiros com DF divididos em diferentes grupos etários. Os resultados mostraram que a frequência do genótipo Hp2-2 nesses pacientes foi menor do que a do Hp1-1, ao passo que o oposto foi observado em um grupo controle adulto. Além disso, foi observado que nos pacientes com idade superior a 20 anos, a frequência de Hp2-2 diminuía com o aumento da idade, enquanto que nos controles

permanecia estável. As diferenças nas frequências genótípicas foram constatadas, sem, no entanto, atingir significância estatística (Santos et al., 2011).

Nesse contexto, as diferentes capacidades antioxidantes e as propriedades imunomodulatórias dos três genótipos/fenótipos da Hp ganham importância para verificar o possível papel de modulador na AF.

1.7.2 Polimorfismo do CCR5

O gene CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*), que codifica o receptor de quimiocinas β , foi relacionado ao estado inflamatório crônico nos pacientes com AF. Trata-se de um receptor de quimiocinas presente principalmente em células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos T, com papel relevante na migração dessas células para os sítios inflamatórios, direcionando uma resposta imune envolvendo um padrão de citocinas Th1. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 3, formando um *cluster* com outros genes receptores de quimiocinas (Vargas et al., 2006).

Em 1996, Liu et al. descreveram um alelo variante com deleção de 32pb denominado CCR5 Δ 32; este origina uma proteína truncada, com consequente perda do receptor de superfície celular envolvido na resistência relativa à infecção pelo HIV-1. Sabendo-se que a resposta imune Th1 está associada à inflamação, Chies & Hutz (2003) propuseram que a presença do alelo CCR5 Δ 32 não funcional conferiria maior vantagem aos pacientes por implicar em resposta Th1 menos eficiente. Não se sabe, no entanto, se há um padrão preferencial das citocinas produzidas na resposta da célula T dos pacientes com AF portadores do alelo CCR5 Δ 32.

1.7.3 microRNAs

Mais recentemente, os microRNAs (miRNAs) têm recebido destaque por representar outra classe de candidatos a moduladores da gravidade clínica na AF (Sangokoya et al., 2010). Essas pequenas moléculas de RNA fita simples de 18–22 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas, regulam a expressão dos seus genes alvo de maneira pós-transcricional, induzindo à degradação do RNAm ou reprimindo sua tradução (Erson & Petty, 2008; Blahna & Hata, 2012). O miRNA Lin4 (*Lineage-deficient-4*) foi inicialmente identificado em *Caenorhabditis elegans*, em 1993 por um grupo da universidade de Harvard, sendo nesta época associado à regulação do desenvolvimento larval nesse nematódeo e, desde a descoberta inicial, a regulação gênica dependente de miRNA tem sido amplamente investigada em vários organismos eucariontes (Erson & Petty, 2008).

Atualmente, existem mais de 3600 miRNAs maduros descritos no genoma humano (miRBase v.19, Agosto 2012) e um único miRNA pode, potencialmente, ter como alvo cerca de 200 transcritos diferentes que podem atuar em diversas vias celulares (Erson & Petty, 2008), constituindo assim uma classe considerável de reguladores gênicos. Estimativas indicam que mais de 60% de todos os RNAs mensageiros de mamíferos são alvos previstos de miRNAs (Blahna & Hata, 2012).

Os miRNAs são fortemente conservados entre os vertebrados, invertebrados e plantas; são transcritos a partir de genes individuais, às vezes agrupados, e localizados em regiões intergênicas ou em íntrons ou éxons de genes codificadores de proteínas. Em humanos localizam-se, predominantemente, em íntrons (Cortez et al., 2011). A biogênese dos miRNAs (Figura 7) tem início no núcleo, onde são transcritos pela *RNA Pol II* em um

longo miRNA primário (pri-miRNA), cuja estrutura em forma de grampo é clivada no núcleo pela *RNase III* (Drosha) em um transcrito curto miRNA precursor (pré-miRNA) e, subsequentemente, é exportado, com auxílio da exportina-5, para o citoplasma onde sofre um processamento secundário pela enzima Dicer, resultando em um miRNA de fita dupla. O *duplex* de miRNA contém uma fita passageira e uma guia, esta última é incorporada ao complexo protéico *RNA-induced silencing complex* (RISC) e direcionada ao RNAm alvo com o qual pode apresentar tanto o pareamento perfeito quanto a complementaridade parcial, e resultar na degradação ou na repressão da tradução do RNAm, respectivamente (Blahna & Hata, 2012).

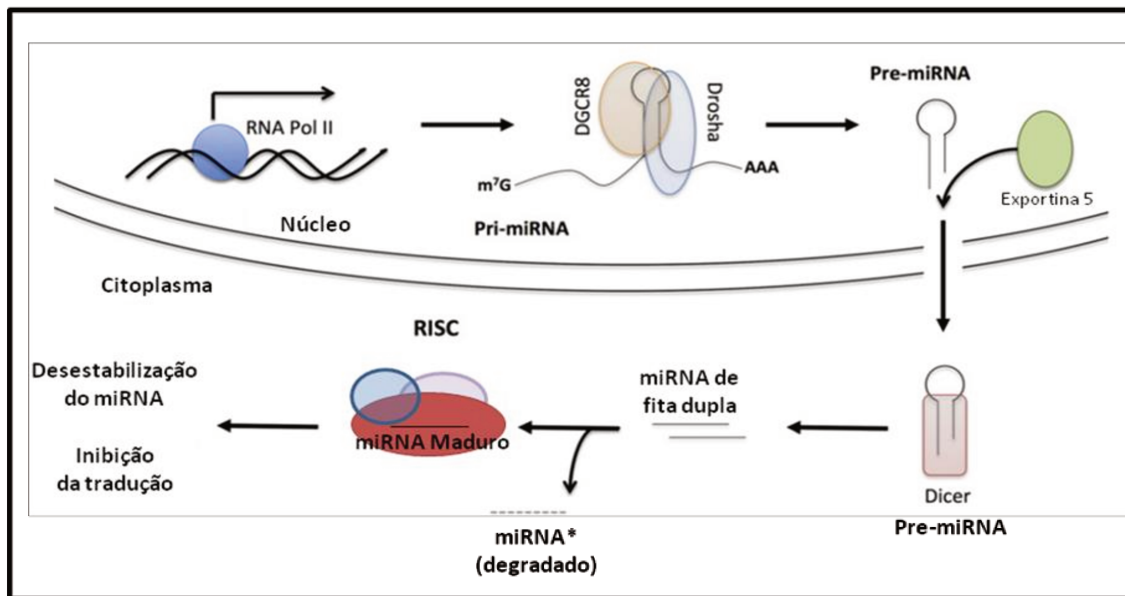


Figura 7: Biogênese do miRNA (adaptada de Blahna & Hata, 2012).

Apesar de se estar apenas no início do entendimento da biologia dos miRNAs, observa-se que os mesmos estão envolvidos praticamente em todos os processos biológicos, e que a expressão anormal destes pequenos RNAs pode estar relacionada a diversas doenças (Cortez et al., 2011).

Dados recentes têm demonstrado que o miR-155 representa uma pequena molécula de RNA tipicamente multifuncional. Até o momento, as evidências indicam que essa molécula tem perfis distintos de expressão e desempenha um papel crucial em vários processos fisiológicos e patológicos, tais como diferenciação de linhagem hematopoiética, inflamação, câncer e imunidade (Faraoni et al., 2009).

A resposta inflamatória envolve a indução de centenas de genes, em um processo minuciosamente regulado para atingir o objetivo e evitar as consequências patológicas de uma expressão gênica anormal. O miR-155 foi identificado e caracterizado como componente da resposta dos macrófagos primários a diferentes tipos de mediadores inflamatórios, como observado por Taganov et al., em 2006. Nesse experimento a expressão desse miRNA, em uma linhagem celular monocítica humana, foi induzida por LPS; outros pesquisadores como O'Connell et al., em 2007, relataram resultados semelhantes com a utilização de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α , em cultura de macrófagos e monócitos (Taganov et al., 2006; O'Connell et al., 2007).

Recentemente, foi relatado em pacientes com artrite reumatóide que o miR-155 é importante para a ativação inflamatória das células mielóides humanas e que sua superexpressão em células CD14⁺ do sangue periférico conduziu a diminuição da expressão do SHIP-1 (*Src homology 2-containing inositol phosphatase-1*), um inibidor da inflamação, e a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e TNF- α . Foi hipotetizado que o miR-155 poderia aumentar diretamente os níveis de TNF- α , aumentando a estabilidade transcricional por meio da ligação à região 3'UTR. Alternativamente, o miR-155 poderia ter como alvo os transcritos de genes que codificam proteínas conhecidas por serem repressoras da tradução de TNF- α . Dessa forma, a via de miR-155/SHIP-1 pode ser parcialmente responsável pela ativação pró-inflamatória excessiva de células mielóides.

Entretanto, não se podem excluir outros papéis possíveis para alvos regulados pelo miRNA-155 (Kurowska-Stolarska et al., 2011).

As possíveis funções dos miRNAs nos eventos clínicos da AF ainda não estão bem estabelecidas e poucos estudos são encontrados na literatura. Em 2008, Chen et al. demonstraram que a expressão de miRNAs em eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com AF exibiam diferença significativa. Em outro estudo no ano de 2010, o grupo liderado pelo pesquisador Chi analisou a expressão de miRNAs de eritrócitos para identificar um grupo de pacientes com DF que apresentava um fenótipo de anemia mais grave. Nesse estudo foi observado que a expressão aumentada do miR-144 no eritrócito estava associada a quadro de anemia mais intenso e, nesse sentido, foi postulado um mecanismo para explicar esta associação. A expressão aumentada do miR-144 leva a uma diminuição da expressão do seu alvo, o fator de transcrição NRF2 (fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2). Sob estresse oxidativo, o NRF2 liga-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE), encontrado nos promotores de genes essencialmente envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. A ligação do NRF2 ao ARE é importante para a expressão coordenada de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (GPX1) e glutathione (GSH). A expressão regulada pelo NRF2 dos genes associados ao ARE, especialmente aqueles envolvidos na biossíntese e reciclagem da GSH, demonstrou ser importante para a sobrevivência das células durante o estresse oxidativo em vários modelos *in vivo* e *in vitro*. Assim, como consequência da redução da expressão do NRF-2, é observada a diminuição dos genes-alvo importantes para a tolerância ao estresse oxidativo, especialmente, em ambientes sob estresse elevado, como observado nas DF. Desse modo, esse desequilíbrio pode explicar a capacidade antioxidante comprometida, a suscetibilidade ao estresse oxidativo, a hemólise e a anemia grave

observada nesses pacientes. Em conjunto, os resultados sugerem que os miRNAs eritróides podem servir como moduladores genéticos da DF e podem fornecer novas evidências para a heterogeneidade clínica observada nessa doença (Sangokoya et al., 2010).

A classe dos miRNAs está emergindo como fator na fisiopatologia de diversas doenças e, o fato de um único miRNA modular diferentes vias regulatórias simultaneamente, torna-os candidatos a moduladores em potencial. Portanto, uma melhor compreensão da complexa natureza das interações dos miRNAs com múltiplas vias inflamatórias pode fornecer a identificação de alvos e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar se os genótipos da Hp podem influenciar o estado inflamatório na AF por meio da comparação dos níveis de determinados parâmetros a ele relacionados, em amostras de pacientes adultos acompanhados no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE).

Objetivos específicos

Comparar os parâmetros abaixo relacionados entre os três grupos de pacientes subdivididos de acordo com os genótipos da Hp:

- Níveis plasmáticos/séricos e/ou taxas de expressão gênica dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , do mediador anti-inflamatório IL-10 e da CRP;
- Níveis séricos das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sL-selectina;
- Concentração plasmática dos marcadores vasculares FvW:Ag e Dímeros-D;
- Taxas de expressão gênica da HP e do miR-155 em células mononucleares;
- Dados clínicos e laboratoriais (hematológicos e bioquímicos);
- Presença do polimorfismo CCR5 Δ 32.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Para este estudo foram convocados, no período de 11 de janeiro a 09 de fevereiro de 2010, noventa e dois (n=92) pacientes com AF, previamente genotipados em relação ao gene HP (Santos et al., 2011), em seguimento no Ambulatório de Hemoglobinopatias do Hospital HEMOPE. Eles encontravam-se em fase estável da doença, na ausência de infecções ou de processos inflamatórios. Os critérios de exclusão foram a transfusão sanguínea nos últimos três meses antecedentes à avaliação e/ou terapia com Hidroxiureia. Dessa forma, procurou-se estratificar os pacientes de acordo com os genótipos Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2 de forma proporcional, podendo assim, ser considerada uma amostragem de conveniência. A idade dos pacientes variou entre 18-54 anos (com mediana de 27 anos), sendo 51 deles do sexo masculino (55,4%) e 41 do sexo feminino (44,6%). Em relação aos genótipos da Hp, 27 pacientes eram Hp1-1 (29,35%), 37 Hp2-1 (40,22%) e 28 Hp2-2 (30,43%).

O diagnóstico laboratorial da HbS foi realizado no Laboratório de Hemoglobinopatias do Hospital HEMOPE, que é um dos mais importantes centros de referência no atendimento e na investigação dos pacientes com DF no país, e baseou-se no eritograma, na eletroforese de Hb em pH alcalino e na Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC – VARIANT II / BIO-RAD, CA, EUA); a HbS foi confirmada pelo teste de solubilidade em tampão fosfato 2,4M na presença de ditionito de sódio (Dacie e Lewis, 2006).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para Estudos em Seres Humanos da Fundação HEMOPE em 22/07/2009, sob o registro de nº 001/2009, de

acordo com o previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo 1).

Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP.

3.3 SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A separação das amostras dos pacientes foi realizada no Laboratório de Hemoglobinopatias do Hospital Hemope. As amostras de sangue dos 92 pacientes foram coletadas em tubos de coleta contendo o anticoagulante apropriado, centrifugadas de acordo com a exigência para cada tipo de material, em até trinta minutos após a coleta.

➤ **Separação do plasma em EDTA:**

As amostras foram coletadas em tubo (5,0 ml) contendo EDTA como anticoagulante, centrifugadas por 15 minutos a 1000g, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios.

➤ **Separação do plasma em citrato:**

As amostras foram coletadas em tubo (5,0 ml) contendo citrato de sódio como anticoagulante, centrifugadas por 20 minutos a 3000 rpm, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios.

➤ **Separação do soro:**

As amostras foram coletadas em tubo seco (9,0 ml), sem anticoagulante, centrifugadas a 1000g por 15 minutos, aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios.

➤ **Isolamento de células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico:**

As amostras de sangue total dos pacientes foram coletadas em tubos (9,0 ml) contendo heparina lítica como anticoagulante e colocadas sobre duas camadas de *Ficoll-Hypaque* (GE Healthcare) de densidades de 1.119 g/L e 1.077 g/L, respectivamente (Figura 8). Após a separação das células mononucleares e polimorfonucleares por centrifugação a 700g por 30 minutos, as células foram lavadas com PBS (1X) pH 7,4. As hemácias contaminantes foram lisadas com tampão (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃) por 15 minutos à 4°C e lavadas novamente com PBS (1X) antes de serem acondicionadas no *TRIzol* (Invitrogen, Life Technologies) e armazenadas em freezer -80°C.

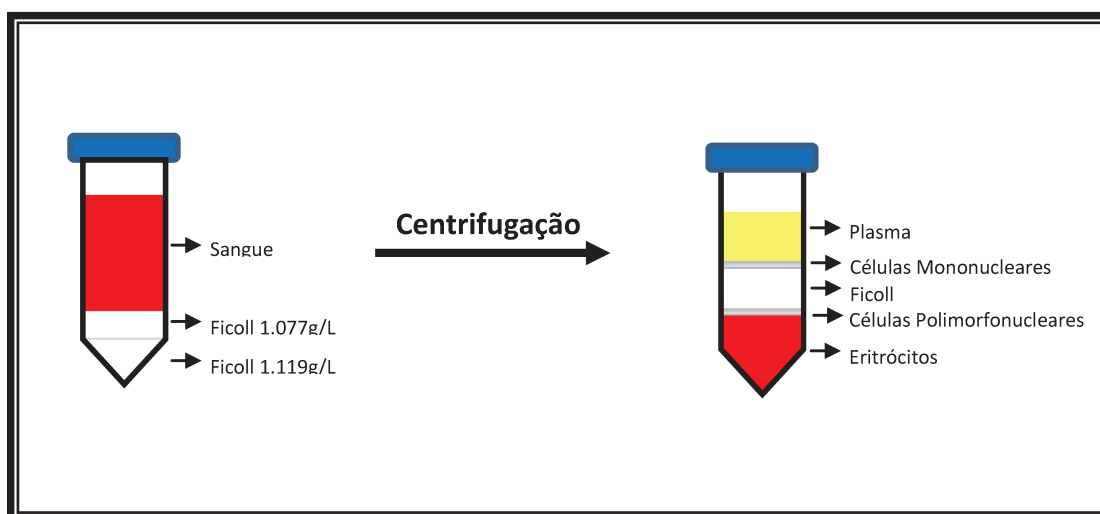


Figura 8: Representação esquemática da separação de células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico com duas densidades de *Ficoll-Hypaque*.

Após a coleta/separação, todo o material foi encaminhado a Unicamp para a realização dos ensaios.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Determinação dos genótipos de Hp pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA dos pacientes foram extraídas previamente, por Santos et al. (2011), a partir dos leucócitos do sangue periférico, pelo método orgânico (fenol-clorofórmio) (Davis et al., 1986). Os genótipos da Hp desses pacientes foram determinados previamente por Santos et al. (2011), a partir da amplificação seletiva dos diferentes alelos, conforme descrito por Yano et al. (1998) (Figura 9).

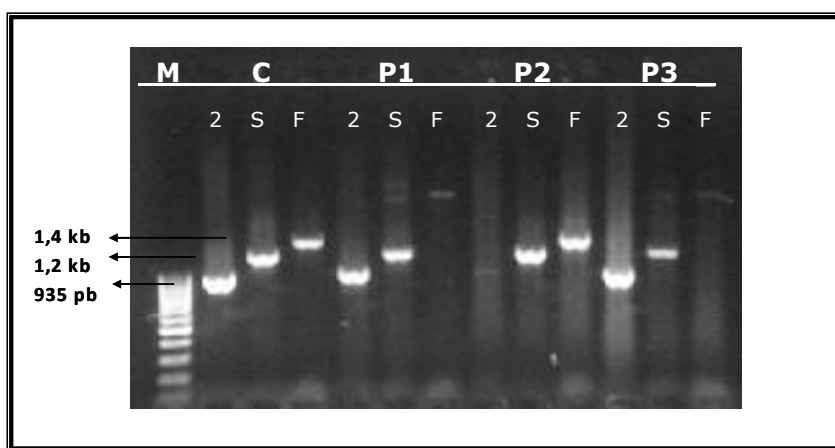


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação dos produtos específicos para cada alelo da Hp. Legenda: M - Marcador de peso molecular ladder 100 pb (Fermentas); C: Controle HP2, HP1S, HP1F; P1: Paciente 1 - Hp2-1S; P2: Paciente 2 - Hp1S-1F; P3: Paciente 3 - Hp2-1S.

3.4.2 Coleta dos dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos, conforme roteiro estruturado para essa apreciação (Anexo 2). A dosagem plasmática de creatinina foi realizada pelo método de Jaffé (Roche, Basileia, Suíça), especificamente para a pesquisa e, com base nessa dosagem, foi determinada a estimativa da Taxa de Filtração Glomerular (eTFG), calculada pela fórmula do MDRD (*Modified Diet in Renal Disease*) utilizando-se três parâmetros: $[eTFG \text{ (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 175 \times (\text{creatinina sérica})^{-1,154} \times (\text{idade})^{-0,203} \times 0,742 \text{ (se mulher)}]$ (Haymann et al., 2010). Para as

comparações estatísticas, a insuficiência renal foi definida como eTFG <60 ml/min/1,73m² e hiperfiltração renal como eTFG >130 ml/min/1,73m² e >140 ml/min/1,73m² para mulheres e homens, respectivamente (Haymann et al., 2010).

3.4.3 Dosagens séricas das moléculas de adesão

As moléculas de adesão (sVCAM-1, sICAM-1 e sL-Selectina) foram dosadas por kit comercial de ELISA (*Quantikine ELISA Kits*, R&D Systems, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, nos 92 pacientes com AF.

3.4.4 Dosagens plasmáticas/séricas de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α

As citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) foram dosadas por kit comercial de ELISA (*Quantikine High Sensitivity ELISA Kits*, R&D Systems, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, nos 92 pacientes com AF. Já a quimiocina (IL-8) foi quantificada por outro kit comercial de ELISA (Elisa Kit II, BD, San Diego, EUA).

3.4.5 Pesquisa da deleção do CCR5 Δ 32

A pesquisa da deleção CCR5 Δ 32 foi realizada por PCR, para a qual foram desenhados e sintetizados *primers* específicos para a região que flanqueia a deleção, no gene CCR5 (CCR5 Δ 32_F e CCR5 Δ 32_R). As sequências dos *primers* constam na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para determinar a deleção de 32 pb no gene o polimorfismo CCR5 Δ 32.

Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3')
CCR5 Δ 32_F	CTTGGGTGGTGGCTGTGTTT
CCR5 Δ 32_R	AGTTTTTAGGATTCCCGAGTAGC

A reação de PCR foi padronizada no termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf), durante 30 ciclos (96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto), em volume final de 30,0 µl, contendo 0,05U da *Taq* DNA Polimerase, 0,1mM de dNTP's, 100nM de cada *primer*, 3,0mM de MgCl₂, 1x do tampão da enzima, 200,0 ng de DNA e H₂O deionizada para completar o volume final. Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio e os fragmentos foram visualizados sob transiluminação com luz ultravioleta (UV). A amplificação do alelo selvagem gera um produto de 206pb, enquanto que o alelo mutante (CCR5Δ32) gera um produto de 174pb (Figura 10).

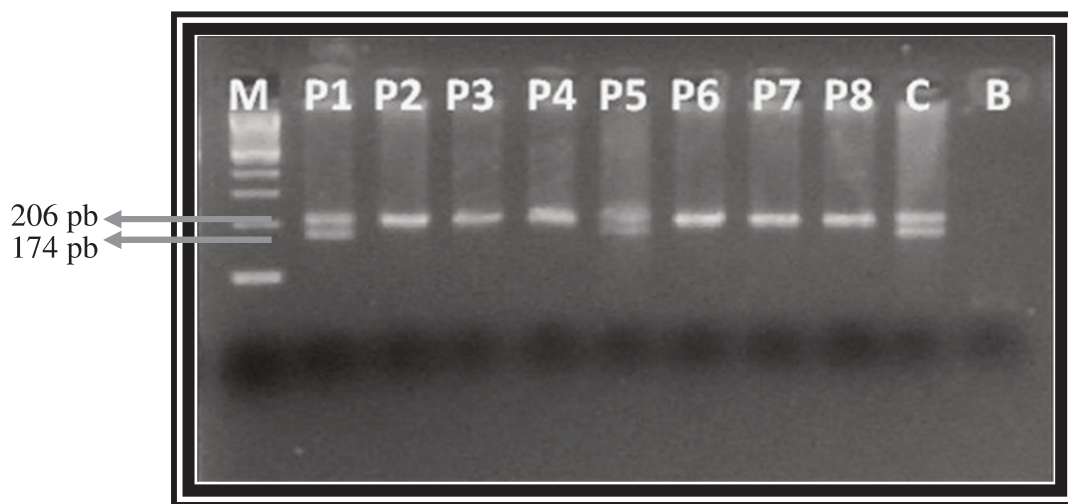


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose identificando a deleção de 32 pb em pacientes com AF. **M:** Marcador de peso molecular (ladder 100pb); **P1 e P5:** Pacientes heterozigotos da deleção CCR5Δ32; **P2-P4 e P6-P8:** Pacientes sem a deleção (alelos selvagens); **C:** Controle heterozigoto da deleção CCR5Δ32; **B:** Controle negativo da reação (branco).

3.4.6 Ensaio para determinação antigênica do Fator de von Willebrand (FvW:Ag)

Para a pesquisa do antígeno do Fator de von Willebrand (FvW:Ag) foi utilizado plasma obtido a partir das amostras de sangue dos pacientes coletadas em tubo contendo

citrato de sódio como anticoagulante. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP.

As microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo U (NUNC) foram cobertas com 125,0 µl de anticorpo de coelho anti-von Willebrand (anticorpo de captura) diluído em tampão de sensibilização, na concentração final de 7 µg/ml por 12 horas à 4°C. Os poços das placas foram lavados 4 vezes com 200,0 µl de tampão de lavagem, e em seguida, foram adicionados 170,0 µl do tampão de cobertura na placa que foi incubada por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 4 vezes com 200,0 µl de tampão de lavagem, com o intuito de remover o excesso de albumina presente no tampão de cobertura. Para dosar o antígeno do FvW foi realizada uma curva de calibração, com concentrações progressivas de um calibrador de valor conhecido para FvW:Ag que variavam de 6,25-100%, supondo que o calibrador tenha como referência 100% para FvW. Em cada poço da microplaca foi colocado 100,0 µl das diluições da curva de calibração, dos controles normal e patológico e do plasma dos pacientes, todos em duplicata, e incubados por 3 horas sob agitação a temperatura ambiente. Após essa incubação, as placas foram lavadas novamente e, em seguida, 100,0 µl de anticorpo de coelho anti-von willebrand conjugado com peroxidase e diluído com tampão do conjugado (1/8000), foram adicionados em cada poço, incubando-se as microplacas por 1 hora a temperatura ambiente. Ao final dos 60 minutos, as placas foram lavadas e a cada poço foi adicionado um volume de 100,0 µl de OPD diluído em tampão de substrato. As placas ficaram sob agitação e protegidas da luz e após 15 minutos a reação foi bloqueada com a adição de 50,0 µl de ácido sulfúrico. Em seguida, foi realizada a leitura das microplacas no leitor de ELISA em um comprimento de onda de 492 nm.

3.4.7 Ensaio para determinação dos Dímeros-D

Os Dímeros-D são os produtos terminais de degradação do coágulo de fibrina, sendo os únicos que realmente certificam a presença da fibrina estabilizada. A dosagem dos Dímeros-D tem uma importância particular no diagnóstico de exclusão da doença tromboembólica venosa. Associado a estudos de probabilidade clínica, uma concentração inferior a um limiar pré-determinado por esses estudos, permite excluir a presença de uma trombose venosa profunda ou de uma embolia pulmonar em pacientes não hospitalizados com suspeita dessas manifestações clínicas. Por outro lado, várias situações fisiológicas ou clínicas podem levar a um aumento dos Dímeros-D, independentemente do aparecimento de trombose, destacando-se a reação inflamatória, comumente presente na AF. Visto isso, o intuito da dosagem dos Dímeros-D é a sua possível utilização, em associação a eventos clínicos e dados laboratoriais, como marcador inflamatório da referida doença.

Para a dosagem quantitativa dos Dímeros-D nos pacientes com AF foi utilizado o kit VIDAS[®] D-Dimer Exclusion[™] (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) que permite a determinação imunoenzimática (ELFA - *Enzyme Linked Fluorescent Assay*) dos produtos de degradação da fibrina no plasma humano, obtidos a partir das amostras de sangue coletadas em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante. O princípio do teste está fundamentado em duas etapas com detecção final da fluorescência, realizadas automaticamente no aparelho miniVIDAS[®] Biomérieux. Na primeira etapa, a amostra é transferida para um poço que contém anticorpo monoclonal anti-Dímeros-D adsorvido na sua superfície, marcado com fosfatase alcalina. A amostra misturada ao conjugado é aspirada e dispensada várias vezes no cone a fim de aumentar a velocidade de reação. Dessa forma, é possível a ligação do antígeno às imunoglobulinas fixadas no cone e, por outro lado, ao conjugado, formando assim um *sandwich*. Na segunda etapa, os poços são

saturados por aspiração e liberação do conjugado, seguida de lavagem para eliminar os componentes não fixados. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é aspirado e dispensado no cone e catalisado pela enzima do conjugado, gerando um produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência é medida a 450nm. O valor do sinal é proporcional à concentração do antígeno presente na amostra. Após a finalização dos testes, os resultados são calculados automaticamente pelo sistema em relação a duas curvas de calibração.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Hematologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.4.8 Determinação da concentração sérica da proteína C reativa (CRP)

A CRP é uma proteína de fase aguda clássica, que tem seus níveis séricos aumentados em decorrência de múltiplos fatores, geralmente relacionados a processos inflamatórios e infecciosos, sendo considerados normais níveis séricos inferiores a 10 mg/L (Ramamoorthy et al., 2012).

O soro para dosagem da CRP foi obtido durante o processo de separação das amostras de sangue. Antes do início do procedimento as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas para eliminar o excesso de lipídeos, e transferidas para tubos de 1,5 mL. A dosagem da CRP foi realizada pela técnica de imunonefelometria no nefelômetro BN II (Dade Behring, Marburg, Alemanha), utilizando o kit *N High Sensitivity CRP* (Dade Behring), constituído por partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal de rato contra CRP humana.

A técnica de nefelometria baseia-se na dispersão da luz ao interagir com complexos antígeno-anticorpo. Dessa maneira, as amostras são colocadas em cuvetas contendo as

partículas revestidas com anti-CRP humana e os anticorpos interagem com a CRP presente no plasma, ocorrendo a formação de imunocomplexos. Um feixe de luz é dirigido para a cuveta que, ao encontrar os imunocomplexos, é desviada e dispersada. A intensidade de luz dispersada é proporcional à quantidade de imunocomplexos presentes na cuveta, sendo possível obter a concentração de antígeno através da utilização de uma curva de referência criada a partir de um padrão com concentrações conhecidas do antígeno e o sinal de luz disperso por cada uma dessas concentrações.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

3.4.9 Extração e quantificação de RNA

As amostras de RNA das células mononucleares e polimorfonucleares dos pacientes foram extraídas com a utilização do reagente *TRIzol* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA), conforme recomendações do fabricante. A quantificação e a pureza das amostras de RNA foram determinadas com o espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, EUA) e em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C e, posteriormente, submetidas a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.4.10 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Inicialmente, as amostras de RNA (2 µg) foram tratadas com a enzima *DNase I* (Invitrogen, Life Technologies). O tratamento consistiu na adição de 0,1 U de *DNase I*, *DNase I Reaction Buffer 1X* (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µl de reação. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, para remoção de DNA contaminante e, posteriormente, a

reação foi bloqueada pela adição de 2,27 mM de EDTA sob incubação a 65°C por 5 minutos. Após esse tratamento, as amostras foram submetidas à síntese cDNA com a utilização do kit *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas Life Sciences, Amherst, EUA). Essa etapa teve início com a adição de 5,0 µM do oligo [dT]₁₈, *Reaction Buffer 1X*, 1,0 U de *RiboLockTM RNase inhibitor*, 1,0 mM de dNTP mix e 10,0 U de *RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse transcriptase*. A reação ocorreu por 60 minutos a 42°C, seguida de 5 minutos a 70°C. Ao término dessa etapa, os transcritos foram quantificados e armazenados a -80°C.

3.4.11 Verificação da síntese de cDNA

As amostras de cDNA, transcritas de acordo com o protocolo acima, foram submetidas a uma reação de PCR para amplificação de um fragmento de 640 pb do gene da beta actina (ACTB), com a finalidade de verificar a qualidade do cDNA transcrito. As reações foram realizadas no termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, EUA), durante 35 ciclos (94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 40 segundos) contendo 1,0 µL de cDNA (aproximadamente 1µg), tampão da *Taq DNA Polimerase 1X*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 mM de dNTP, 200 nM de cada *primer* para o gene ACTB: ACTB_F (5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3') e ACTB_R (5'-TCGCTCCAACCGACTGCTGT-3'), 0,03 U de *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) e H₂O destilada para um volume final de 50,0 µL. Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, e os fragmentos foram visualizados sob transiluminação com UV, de acordo com a Figura 11.

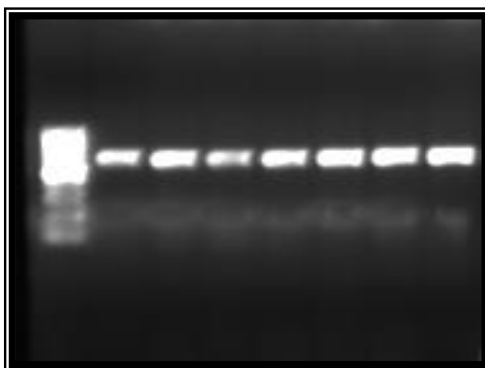


Figura 11: Amplificação de um fragmento de 640 pb do gene ACTB de amostras de cDNA dos monócitos de pacientes com AF.

3.4.12 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma técnica bastante utilizada para avaliar a expressão gênica e está fundamentada no monitoramento da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda ou de um agente intercalante de DNA de dupla fita.

O sistema de detecção utilizado foi o *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, EUA), que contém todos os reagentes necessários para a PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, *AmpliTaq Gold®*), além do agente intercalante (*SYBR Green*).

3.4.13 Desenho dos *primers* para a reação de qPCR

Uma atenção especial deve ser dispensada no desenho dos *primers* para garantir a especificidade e reprodutibilidade da reação de qPCR. Dessa forma, alguns cuidados devem ser considerados como, por exemplo, a localização dessas sequências nos genes, o tamanho e porcentagem de GC do amplicon, que estão diretamente relacionados com o TM esperado para o produto, o que garante a especificidade da reação. Os *primers* foram desenhados (Tabela 2) com a utilização do software *Primer Express* (Applied Biosystems, Life

Technologies, Foster City, EUA) e a análise das sequências foram complementadas com a utilização dos programas *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e *Gene Runner*.

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados para a avaliação da expressão gênica.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento
IL-1 β _RT_F	5' CAGGGACAGGATATGGAGCA 3'	106 pb
IL-1 β _RT_R	5' GATTCTTTTCCTTGAGGCC 3'	
IL-6_RT_F	5' CCAGGAGCCCAGCTATGAAC 3'	64 pb
IL-6_RT_R	5' CCCAGGGAGAAGGCAACTG 3'	
IL-8_RT_F	5' CTCTCTTGGCAGCCTTCCTG 3'	71 pb
IL-8_RT_R	5' TTCTTTAGCACTCCTTGGCAA 3'	
IL-10_RT_F	5' CTGAGAACCAAGACCCAGACATC 3'	98 pb
IL-10_RT_R	5' AAGAAATCGATGACAGCGCC 3'	
TNF- α _RT_F	5' GGCCCAGGCAGTCAGATCA 3'	143 pb
TNF- α _RT_R	5' CTCTCAGCTCCACGCCATTG 3'	
HP_RT_F	5' GCTGTCATTGCCCTCCTGC 3'	82 pb
HP_RT_R	5' AGCCGTCATCTGCGATATCC 3'	
ACTB_RT_F	5'- AGGCCAACCGCGAGAAG-3'	79 pb
ACTB_RT_R	5'- ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'	
GAPDH_RT_F	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	89 pb
GAPDH_RT_R	5'- CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'	

3.4.14 Padronização da concentração dos *primers*

Na reação de qPCR, a concentração ótima de *primer* deve ser a mínima suficiente para permitir que o gene de interesse apresente o menor Cq (*Quantification Cycle*), indicando que o gene foi amplificado mais precocemente. Nessa padronização, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram realizadas reações para cada um dos conjuntos de *primers* nas concentrações finais de 70 nM, 150 nM e 300 nM. Na Tabela 3 podemos observar as concentrações dos *primers* padronizadas.

Tabela 3: Concentração dos *primers* e eficiência obtida para a reação de qPCR.

<i>Primer</i>	Concentração utilizada	Eficiência da reação
IL-1 β	300 nM	99,35%
IL-6	70 nM	99,9%
IL-8	150 nM	99,6%
IL-10	70 nM	99,9%
TNF- α	150 nM	99,7%
HP	150 nM	99,5%
ACTB	150 nM	99,4%
GAPDH	150 nM	99,8%

3.4.15 Eficiência da reação de qPCR

A eficiência da reação de qPCR está diretamente relacionada à confiabilidade e a reprodutibilidade. Dessa forma, para atingi-los são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, as amplificações devem apresentar 100% de eficiência a cada ciclo da reação de PCR. Nesta etapa, utilizamos a concentração que foi padronizada anteriormente e variamos a concentração da amostra. A eficiência de amplificação é calculada a partir da seguinte fórmula: $10^{(-1/slope)}$, sendo que o *slope* significa o coeficiente de inclinação da curva e, quando aplicado à fórmula de eficiência, o desejado é que o valor obtido seja próximo de 2, significando que a cada ciclo de amplificação o produto gerado foi duplicado e isso equivale a 100% de eficiência. As curvas de eficiência dos *primers* padronizados para esse estudo encontram-se na Figura 12, enquanto que a eficiência de reação para cada conjunto de *primer* encontra-se na Tabela 3.

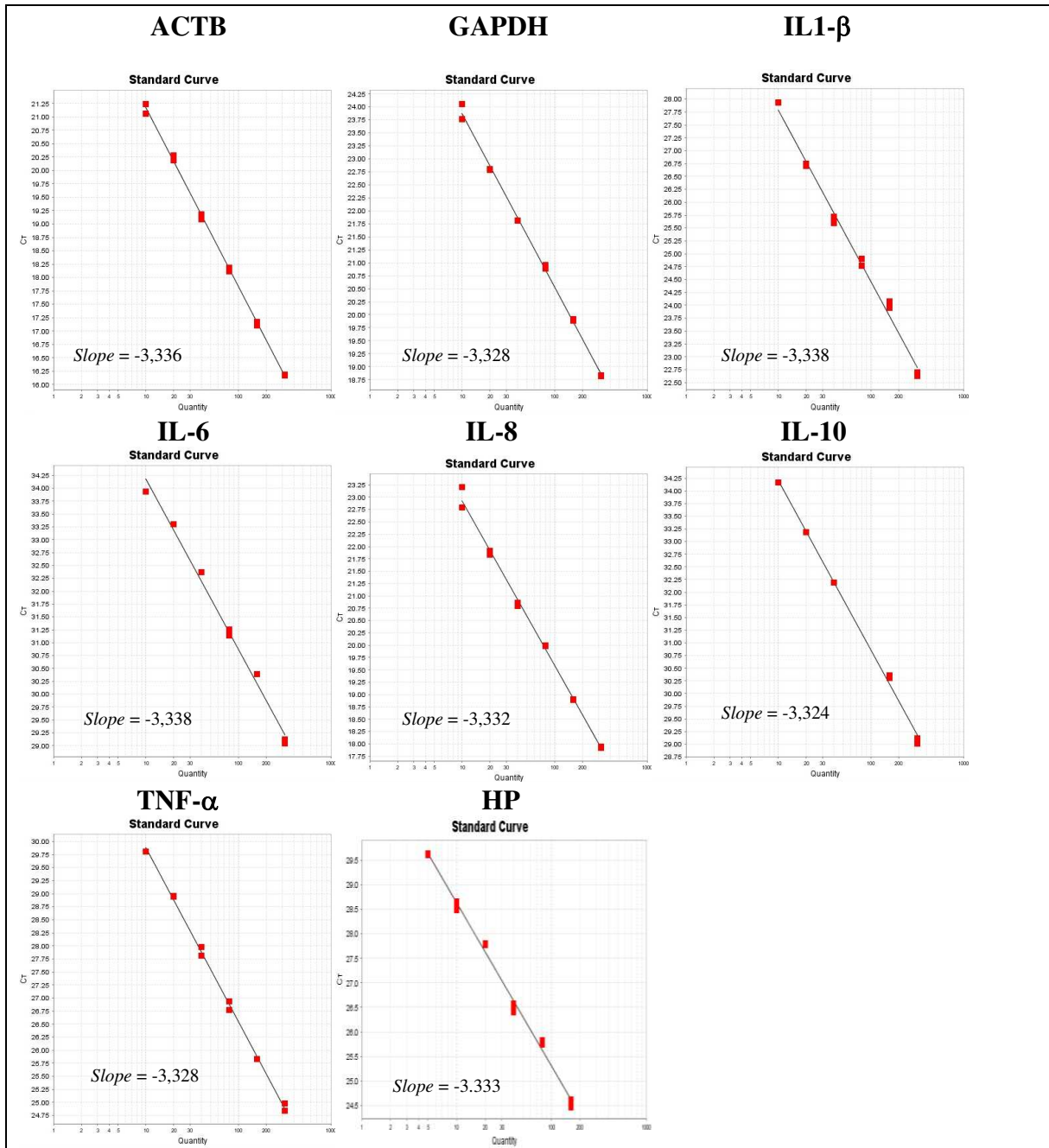


Figura 12: Análise da eficiência da reação de amplificação.

3.4.16 Reação de qPCR

As reações foram realizadas em placas de 96 poços com tampas ópticas que permitem a passagem da luz e os ensaios foram realizados em duplicata, em um volume total de 12,0 µL, contendo: 1X *SYBR Green*, a concentração adequada para cada conjunto de *primer* (Tabela 3) e 5,0 ng/µL da amostra de cDNA. Para verificar a qualidade da reação no que se refere principalmente a contaminantes foram utilizados controle-negativos, sem adição de amostra (NTC – *no template controls*). As condições de ciclagem foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao término da reação, uma etapa de 20 minutos foi adicionada, na qual a temperatura foi elevada de forma gradual de 60°C para 95°C. Nesta etapa, denominada *Melting curve*, ocorre a desnaturação do produto amplificado e, conseqüentemente, a redução da emissão de fluorescência pelo *SYBR Green*, fornecendo informações que asseguram a especificidade da reação.

A detecção da amplificação foi realizada no equipamento *7500 Fast Real-time PCR System* (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, EUA) e os dados obtidos foram gerados em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. O equipamento faz a detecção da fluorescência a cada ciclo de amplificação, permitindo assim, a visualização em tempo real de cada fase da reação (exponencial, linear e platô). Inicialmente, um limiar de detecção é estabelecido (*Threshold*), o qual deve ser posicionado na região de amplificação exponencial, definida como melhor eficiência da reação, e serve como referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência. O ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o *threshold* é denominado de *Cq*, permitindo assim, a comparação entre amostras. Os gráficos gerados permitem analisar a qualidade da

reação (ausência de contaminantes ou produtos inespecíficos) devido à diferença de T_m (Temperatura de *melting* ou curva de dissociação) entre os produtos de PCR. A Figura 13 representa a curva de dissociação.

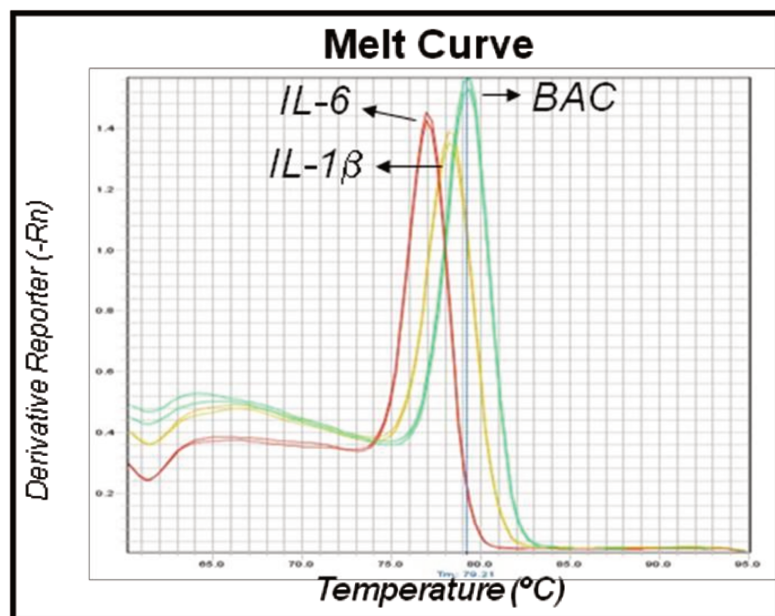


Figura 13: Curva de dissociação para analisar a qualidade da reação e ausência de contaminantes.

3.4.16 Extração de miRNAs e síntese de cDNA

Os miRNAs foram obtidos a partir de RNA dos mononucleares dos pacientes com a utilização do kit comercial - *mirVanaTM miRNA Isolation Kit* (Life Technologies) segundo protocolo do fabricante. Em seguida, a quantificação das amostras foi realizada no espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland, DE) e armazenadas em freezer -80°C.

A síntese de cDNA foi realizada através de reações de transcrição reversa utilizando o *TaqMan[®] miRNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies) e o *TaqMan[®] miRNA*

assay Kit (Life Technologies) que contém o *primer* para a conversão específica do miRNA de interesse.

3.4.17 Expressão do miRNA-155 através da qPCR

A determinação da expressão gênica dos miRNAs foi realizada no equipamento *StepOne Plus™ Real-Time PCR System* (Life Technologies). Para a detecção da amplificação dos miRNAs foram realizadas reações em duplicatas utilizando o sistema de detecção *TaqMan® miRNA Assay* (Life Technologies), no qual uma sonda hibridiza às sequências específicas nos fragmentos amplificados pela PCR. Essa sonda apresenta um fluoróforo em uma das extremidades (*reporter*) e na outra uma molécula que absorve a fluorescência emitida (*quencher*). No processo de amplificação, após hibridização, a sonda é degradada devido à atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão aumentando dessa forma, a intensidade da fluorescência captada pelo equipamento.

Todas as amostras foram ensaiadas em 12,0 µl de volume final, sendo 6,0 µl do reagente *TaqMan® 2X Universal PCR MasterMix*, 3,0 µl mix da amostra de cDNA (5,0 ng/µl de concentração final) e 3,0 µl mix *TaqMan® miRNA Assay*. Em todas as placas foram pipetados os NTC's. As reações foram realizadas em placas de 96 poços e o programa foi iniciado a 95°C/10 minutos com a finalidade de ativar a *AmpliTaq Gold®*, seguido de 40 ciclos nas seguintes condições: 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto. Os miRNAs U47 e U48 foram utilizados como normalizadores da expressão para todas as amostras analisadas. A Tabela 4 apresenta as sequências dos miRNAs analisados.

Tabela 4: Sequências dos miRNAs utilizados no ensaio de expressão.

miRNAs	Sequência dos miRNAs	Assay (Life Technologies)
U47	TAATGATTCTGCCAAATGAAATATAATGATATC ACTGTAAAACCGTTCCATTTTGATTCTGAGGT	001223
U48	GATGACCCCAGGTA ACTCTGAGTGTGTCGCTGA TGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC	001006
miR-155	*UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	002623

*sequência do miRNA maduro.

3.4.18 Análise dos dados da qPCR

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, ou seja, os valores de expressão são normalizados em relação aos genes de referência. Dessa forma, foram utilizados os genes ACTB e GAPDH para os genes IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e HP, e U47 e U48, para o miR-155.

O programa geNorm (Vandesompele, et al., 2002) foi utilizado para o cálculo da média geométrica entre os genes de referência, resultando no denominado Fator de Normalização (FN) da amostra. A expressão do gene de interesse foi estimada pela razão entre o valor de Q (Quantificação relativa) pelo FN da amostra. Dessa forma, o valor obtido foi expresso em unidades arbitrárias (UA).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises descritivas foram realizadas com apresentação de tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas. O teste Qui-quadrado foi utilizado para comparar proporções. A distribuição dos valores de variáveis não-gaussianas em cada grupo de pacientes (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2) foram

comparados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, entre 2 ou 3 grupos, respectivamente. Por fim, para identificar fatores de risco para a manifestação clínica de úlcera de perna foi utilizada a análise de regressão de Cox univariada e múltipla. O processo de seleção de variáveis empregado foi o *stepwise* (passo-a-passo). O valor considerado estatisticamente significativo para os testes foi de 5%. As comparações estatísticas foram realizadas sob orientação da Assessoria de Estatística da Câmara de Pesquisa da FCM/UNICAMP e os *softwares* utilizados para as análises foram o SAS System for Windows, versão 9.2 (SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, EUA) e o SPSS (*version 16*), enquanto que os gráficos foram plotados com a utilização do *software Graph Pad Instat*.

4. RESULTADOS

4.1 Descrição geral dos pacientes e das variáveis

A Tabela 5 apresenta a distribuição dos 92 pacientes em relação aos genótipos da Hp, idade e gênero.

Tabela 5: Distribuição dos 92 pacientes com AF pelos genótipos da Hp, idade e gênero.

Genótipos da Hp		Números de pacientes (%)			
Hp1-1		27 (29,35%)			
Hp2-1		37 (40,22%)			
Hp2-2		28 (30,43%)			
Idade (18-54 anos)		Números de pacientes (%)			
< 27*		44 (47,8%)			
≥ 27		48 (52,2%)			
Idade	Genótipos da Hp				p-valor
	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2		
Média	29,3	29,6	29,1		0,8
Mediana	26	29	27		
Gênero		Números de pacientes (%)			
Feminino		41 (44,6%)			
Masculino		51 (55,4%)			
Gênero	Genótipos da Hp				p-valor
	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2		
Feminino	10 (24,4%)	17 (41,5%)	14 (34,1%)		0,6
Masculino	17 (33,3%)	20 (39,2%)	14 (27,5%)		

*Mediana da idade = 27 anos

Dentre as variáveis analisadas estão: as dosagens plasmáticas/séricas das citocinas, CRP, moléculas de adesão, marcador de disfunção endotelial e de hipercoagulabilidade, e as expressões gênicas.

Para o grupo total de pacientes (n=92) foram calculadas as medianas das variáveis em estudo, as quais são relatadas nas tabelas descritivas (Tabelas 6, 7 e 8).

Tabela 6: Dosagens plasmáticas/séricas de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e da CRP e a taxa de expressão gênica de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , Hp e do miR-155.

Dosagens plasmáticas	n	Mediana (min-max)	Intervalos interquartis	
			P25	P75
IL-1 β (pg/ml)	86	0,37 (0,01-14,88)	0,17	0,99
IL-6 (pg/ml)	92	3,00 (0,33-31,77)	2,09	5,04
IL-8 (pg/ml)	92	7,08 (0,15-191,35)	2,92	13,35
TNF- α (pg/ml)	91	1,37 (0,15-16,03)	0,98	2,26
CRP (mg/dl)	92	0,47 (0,037-5,30)	0,25	0,95

Dosagens plasmáticas	n	Mediana (min-max)	Intervalos interquartis	
			P25	P75
IL-1 β	89	0,08 (0,004-3,71)	0,02	0,26
IL-6	89	0,03 (0,002-3,17)	0,01	0,21
IL-8	89	0,22 (0,002-15,51)	0,08	0,61
IL-10	89	0,31 (0,034-7,82)	0,15	0,76
TNF- α	89	0,15 (0,032-3,39)	0,09	0,34
HP	92	0,25 (0,010-5,96)	0,14	0,50
miR-155	92	0,50 (0,15-1,67)	0,34	0,68

Tabela 7: Dosagens séricas das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sL-Selectina.

Moléculas de adesão	n	Mediana (min-max)	Intervalos Interquartis	
			P25	P75
sVCAM-1(ng/ml)	92	1011,27 (487,3-4777,5)	770,1	1456,0
sICAM-1(ng/ml)	88	236,39 (73,8-908,4)	167,8	346,9
sL-selectina(ng/ml)	92	1378,88 (786,6-2944,9)	1183,0	1564,0

Tabela 8: Dosagens dos marcadores de disfunção endotelial (FvW:Ag) e de hipercoagulabilidade (Dímeros-D).

Marcadores vasculares	n	Mediana (min-max)	Intervalos Interquartis	
			P25	P75
FvW:Ag (%)	92	159,39 (65,5-406,9)	131,6	240,7
Dímeros-D (ng/ml)	92	1521,93 (250,0-8441,8)	1055,0	2103,0

4.3 Descrição dos eventos clínicos

A Tabela 9 resume a frequência dos eventos clínicos relatados nos prontuários dos 92 pacientes com AF. No entanto, uma das dificuldades encontradas durante a coleta de dados foi a heterogeneidade das informações clínicas e, não obstante os inúmeros registros médicos avaliados, a ausência de algumas das informações procuradas. Assim, os dados mostrados na Tabela 9 foram aqueles coletados de modo homogêneo para todos os pacientes, ou seja, a maioria dos pacientes possuía algum registro médico sobre o evento específico.

Ao comparar as frequências de complicações clínicas dos pacientes por nós estudados com aquelas relatadas em outros levantamentos disponíveis na literatura

(Adeyoju et al., 2002; Haymann et al., 2010; Ballas et al., 2012), verifica-se que algumas delas foram menores na presente casuística, o que, se não for uma característica da própria população, é provavelmente resultante do subdiagnóstico ou da falha no registro médico. Diante desse impasse, optamos por avaliar apenas os dados relativos às úlceras de perna, cuja identificação é inequívoca.

Tabela 9: Prevalência dos eventos clínicos distribuídos entre os 92 pacientes com AF.

Evento Clínico	Número de pacientes (%)
CVO	44 (47,8%)
Priapismo* (n=51)	7 (13,7%)
NACF	12 (13,0%)
Colelitíase**(n=83)	54 (65,1%)
AVE	5 (5,4%)
Pneumonia	35 (38,0%)
Úlceras de perna	19 (20,7%)

CVO: Crise Vaso-oclusiva (relato de pelo menos um evento no ano de 2010); Priapismo* Condição apenas para pacientes do sexo masculino; NACF: Necrose Asséptica Cabeça Fêmur; Colelitíase**: Dados faltantes em 9 pacientes; AVE: Acidente Vascular Encefálico.

4.4 Descrição dos dados laboratoriais

De modo semelhante às variáveis clínicas, os dados laboratoriais foram obtidos a partir da análise dos prontuários médicos dos pacientes, seguindo o roteiro estruturado. Contudo, as mesmas dificuldades encontradas durante a coleta dos dados clínicos foram observadas, principalmente, no referente ao momento em que haviam sido realizados os exames laboratoriais. Assim, os dados abaixo foram coletados de modo homogêneo para todos os pacientes, ou seja, a maioria dos pacientes possuía algum exame laboratorial recente sobre o dado estudado.

A Tabela 10 resume as variáveis dos exames laboratoriais dos pacientes com AF.

Tabela 10: Variáveis laboratoriais coletadas dos prontuários médicos dos pacientes com AF.

Dados laboratoriais	n	Média	Mediana	DP	P25	P75
Hb (g/dL)	88	7,9	7,9	1,24	7,0	8,8
Ht (%)	90	24,2	23,9	4,2	21,0	26,8
LEUCO (/mm ³)	88	14.258	11.750	16.031	10.300	14.475
PLT (/mm ³)	89	378.607	356.000	132.170	291.500	452.500
RNI	65	1,11	1,12	0,13	1,03	1,17
R	48	1,01	0,99	0,16	0,92	1,12
Uréia (mg/dL)	83	17,56	15,00	8,87	12,0	20,0
CREA (mg/dL)	92	0,58	0,54	0,20	0,45	0,67
eTFG (mL/min/1,73m ²)	92	163,10	161,54	51,94	122,8	194,0
URICO (mg/dL)	83	5,39	5,10	1,72	4,0	6,2
AST (U/L)	87	52,0	45,00	30,83	32,0	61,0
ALT (U/L)	87	34,0	28,00	26,95	20,0	40,0
BT (mg/dL)	89	5,25	3,40	7,22	2,5	5,3
BD (mg/dL)	89	1,32	0,70	4,10	0,48	0,94
BI (mg/dL)	89	3,83	2,52	4,65	1,73	4,21
RET (%)	75	9,10	8,40	4,40	6,0	10,8
LDH (U/L)	67	927,0	816,0	501,5	553,0	1168,0
HbF (%)	81	8,2	7,20	5,04	4,2	11,0

n: Número de indivíduos; DP: Desvio Padrão; Intervalos interquartis (P25 e P75); Hb: Hemoglobina (g/dL); Ht: Hematócrito (%); LEUCO: Leucócitos (/mm³); PLT: Plaquetas (/mm³); RNI: Referência para Tempo de Atividade da Protrombina; R: Razão para o Tempo da Tromboplastina Parcial Ativada; U: Uréia (mg/dL); CREA: Creatinina (mg/dL); eTFG: estimativa da Taxa de filtração glomerular (mL/min/1,73m²); URICO: Ácido Úrico (mg/dL); AST: Aspartato aminotransaminase (U/L); ALT: Alanina aminotransaminase (U/L); BT: Bilirrubina Total (mg/dL); BD: Bilirrubina Direta (mg/dL); BI: Bilirrubina Indireta (mg/dL); RET: Reticulócitos (%); LDH: Lactato Desidrogenase (U/L); HbF: Hemoglobina Fetal (%).

4.5 Dosagens de citocinas, quimiocina e CRP versus genótipos Hp

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a quimiocina IL-8 e a CRP foram dosadas em amostras de plasma/soro de pacientes com AF divididos em três grupos, de acordo com os genótipos da Hp, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados foi obtida (Figura 14).

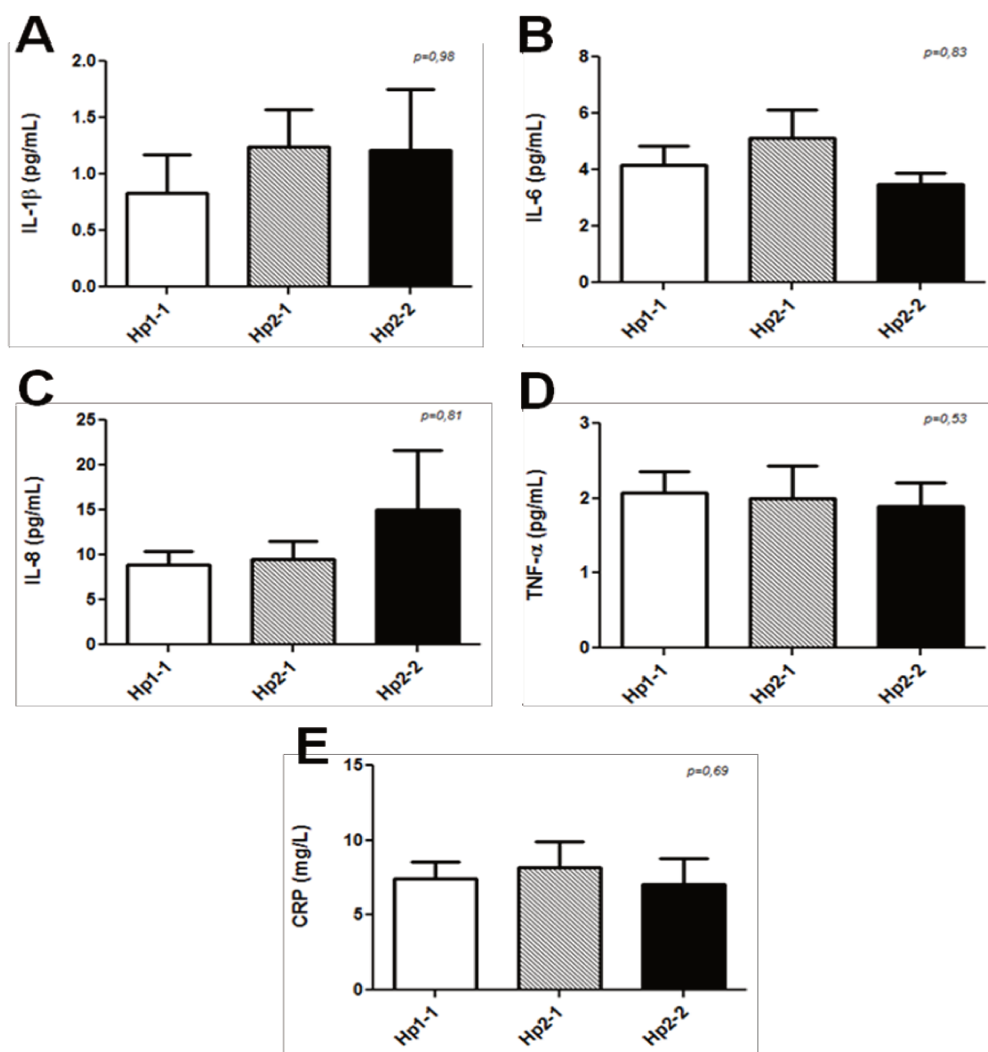


Figura 14: Dosagens plasmáticas ou séricas das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C) e TNF- α (D) (pg/mL) e da CRP (E) (mg/L) entre pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp. O eixo X representa os três diferentes genótipos da Hp e o eixo Y a concentração das variáveis analisadas. Os valores são representados pela média \pm EPM; e o teste de Kruskal-Wallis revelou p-valor $>$ 0,05.

4.6 Dosagens das moléculas de adesão *versus* genótipos Hp

As dosagens plasmáticas das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sL-Selectina foram realizadas em amostras de pacientes com AF divididos em três grupos, de acordo com os genótipos da Hp, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados foi obtida (Figura 15).

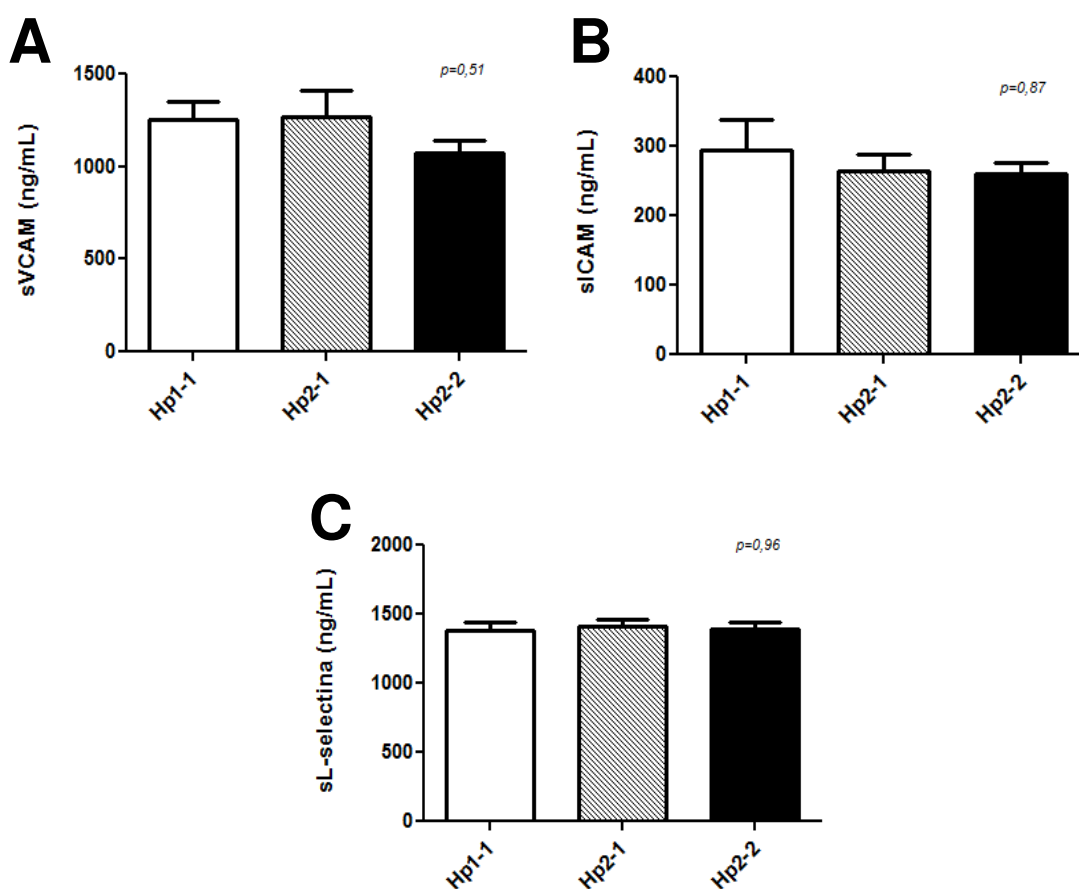


Figura 15: Dosagens plasmáticas das moléculas de adesão sVCAM-1 (A), sICAM-1 (B) e sL-Selectina (C) entre pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp. O eixo X representa os três diferentes genótipos da Hp e o eixo Y a concentração (ng/mL) das variáveis analisadas. Os valores são representados pela média \pm EPM; e o teste de Kruskal-Wallis revelou p-valor $> 0,05$.

4.7 Antígeno do FvW e Dímeros-D versus genótipos Hp

A dosagem plasmática do FvW:Ag, marcador de disfunção endotelial, foi avaliada em amostras de pacientes com AF divididos em três grupos, de acordo com os genótipos da Hp, e foi observado que os níveis estão significativamente diminuídos no grupo de pacientes com o genótipo Hp2-2 quando comparados aos grupos Hp1-1 e Hp2-1 (Figura 16). Por outro lado, a dosagem plasmática dos Dímeros-D, marcador de hipercoagulabilidade, também estava diminuída no grupo Hp2-2 em relação aos outros grupos, porém a diferença não foi suficiente para alcançar a significância estatística (Figura 16).

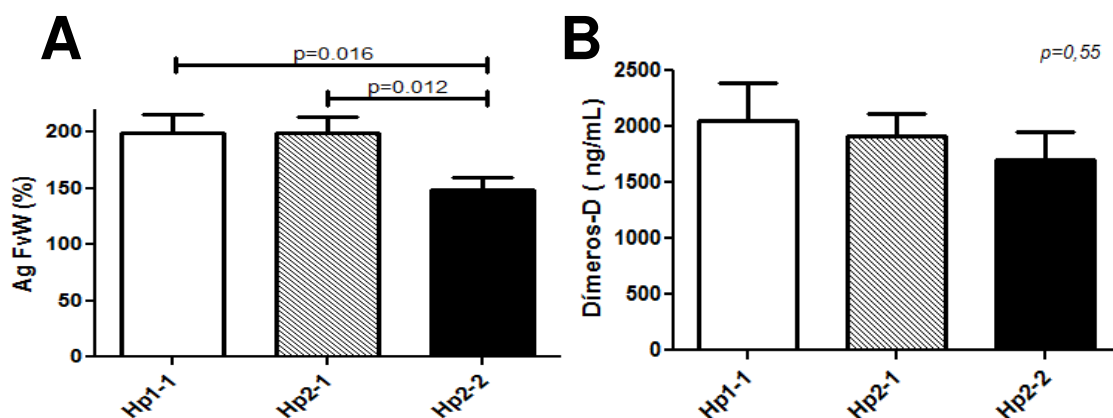


Figura 16: Dosagens plasmáticas do FvW:Ag (%) e do Dímeros-D ($\mu\text{g/ml}$), em pacientes com AF, de acordo com o genótipo da Hp. O eixo X representa os três diferentes genótipos da Hp e o eixo Y a concentração plasmática do FvW:Ag (A) (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,018$) e a dosagem dos Dímeros-D (B) (teste de Kruskal-Wallis, $p=0,55$). Os valores são representados pela média \pm EPM. Teste de Mann-Whitney em relação ao FvW:Ag (Hp1-1 vs Hp2-2, $p=0,016$) e (Hp2-1 vs Hp2-2, $p=0,012$).

A variabilidade nos níveis plasmáticos do FvW está relacionada ao grupo sanguíneo ABO e idade; dessa forma, níveis aumentados dessa glicoproteína são observados tanto com a progressão da idade quanto nos indivíduos de grupos sanguíneos não-O. A tipagem sanguínea do sistema ABO dos pacientes (n=92), na qual os resultados foram expressos em grupo O e grupo não-O, constam na Tabela 11, enquanto o gênero e a idade encontram-se na Tabela 5. Esses fatores não representaram influência para as análises aqui realizadas.

Tabela 11: Distribuição dos pacientes em relação aos grupos sanguíneos (grupo O e não-O) entre os genótipos da Hp.

Grupo Sanguíneo	Genótipos da Hp			p- valor
	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2	
Grupo O	12 (44,4%)	18 (48,6%)	13 (46,4%)	0,9
Grupo não-O	15 (55,6%)	19 (51,4%)	15 (53,6%)	

4.8 Expressão gênica das citocinas, quimiocina, HP e miR-155 versus genótipos Hp

Em dados parciais apresentados no *American Society For Cell Biology Congress – ASCB 2012* (Santos et al., 2012) foi observada diferença significativa na taxa de expressão do miR-155 em polimorfonucleares de pacientes com o genótipo Hp1-1 quando comparados ao genótipo Hp2-2 (Figura 17).

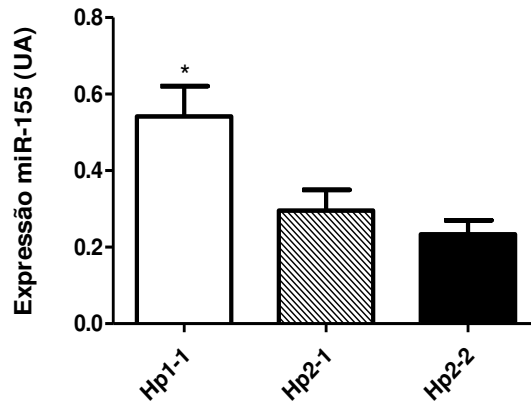


Figura 17: Expressão do miR-155 em polimorfonucleares de pacientes com AF divididos de acordo com os genótipos da Hp (12 pacientes/genótipo). Os valores registados foram normalizados em função da expressão do miR-U47 e do miR-U48. Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,009$ $n=36$). Teste de Mann-Whitney (Hp1-1 vs Hp2-1, $p=0,06$), (Hp2-1 vs Hp2-2, $p=0,54$) e (*Hp1-1 vs Hp2-2, $p=0,002$).

A expressão gênica de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , HP e miR-155 foram avaliadas em mononucleares de pacientes com AF divididos em três grupos, de acordo com os genótipos da Hp, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados foi obtida (Figura 18). Adicionalmente, uma correlação negativa de fraca intensidade entre as expressões do miR-155 e da HP foi observada nessas células.

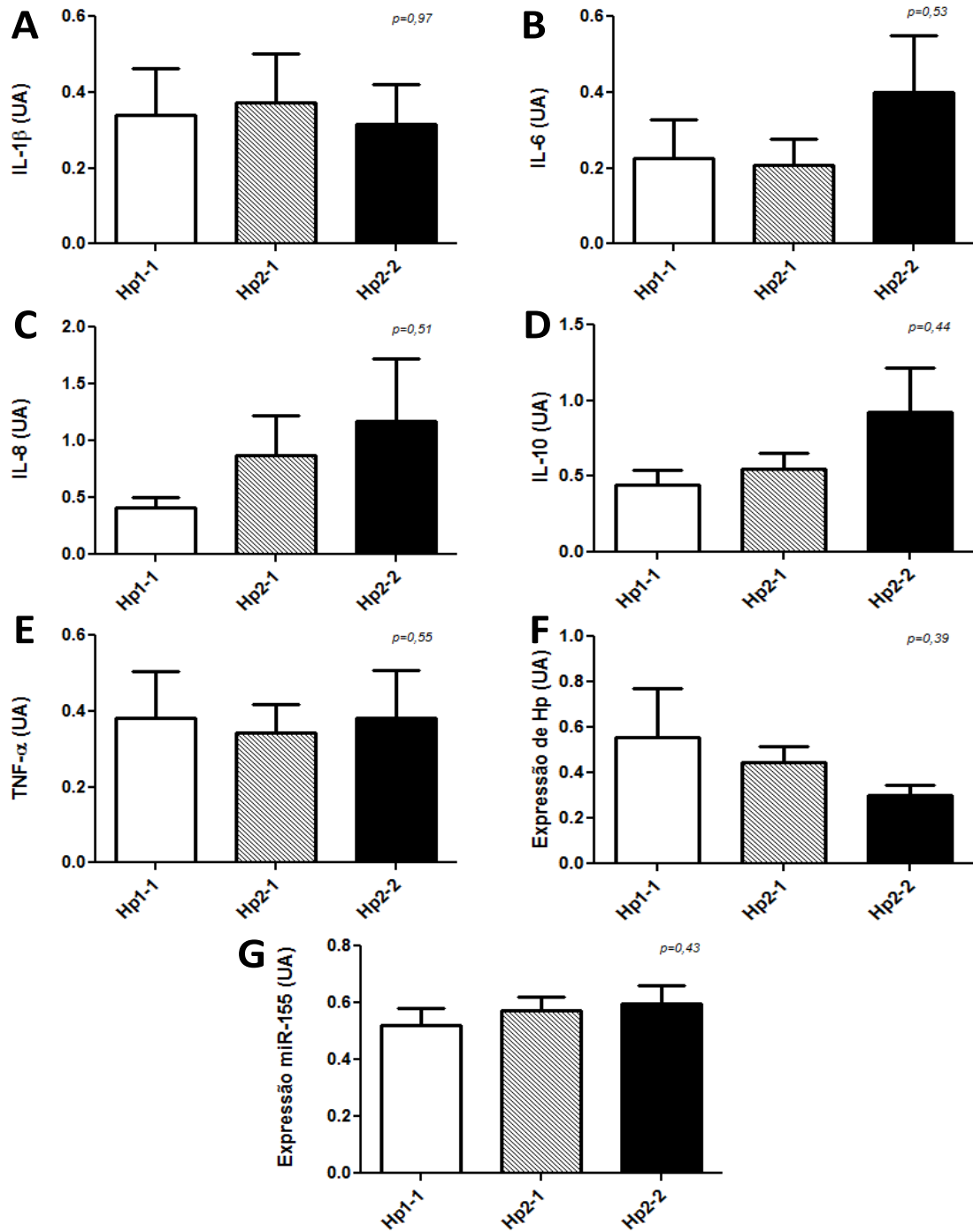


Figura 18: Expressão dos genes IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), TNF- α (E), HP (F) e miR-155 (G) em células mononucleares de pacientes com AF entre os diferentes genótipos da Hp. O eixo X representa os genótipos da Hp e o eixo Y a unidade arbitrária de expressão (UA). Os valores são representados pela média \pm EPM; e o teste de Kruskal-Wallis revelou p-valor $> 0,05$.

4.9 Dados laboratoriais versus genótipos Hp

Não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos da Hp e os dados laboratoriais coletados (hematológicos e bioquímicos). Quanto aos níveis plasmáticos de creatinina e dos valores da eTFG, também não foram encontradas diferenças significativas (Figura 19). De acordo com os valores da eTFG obtidos com a utilização da fórmula simplificada do MDRD (Haymann et al., 2010), observou-se que um paciente apresentava a eTFG abaixo de $60 \text{ mL/min/1,73m}^2$, sendo, dessa forma, excluído das comparações genótípicas para a dosagem de creatinina e da eTFG. Além disso, foi observado que 59 dos 91 pacientes [feminino (n=29) e masculino (n=30)], apresentaram hiperfiltração glomerular, correspondendo a 64,83% dos pacientes.

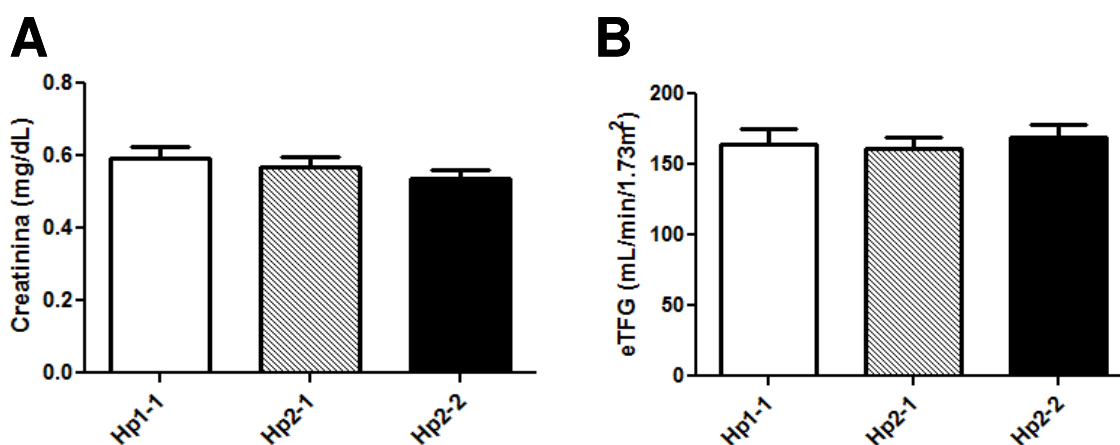


Figura 19: Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL) e a eTFG (mL/min/1,73m^2), calculada pelo método MDRD, em pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp. O eixo X representa os genótipos de Hp e o eixo Y a dosagem de creatinina (A) (Teste de Kruskal-Wallis - $p=0,50$ - $n=91$) a eTFG (B) (Teste de Kruskal-Wallis - $p=0,86$ - $n=91$). Os valores são representados pela média \pm EPM. Teste de Mann-Whitney em relação a Creatinina (Hp1-1 vs Hp2-1, $p=0,69$), (Hp2-1 vs Hp2-2, $p=0,49$) e (Hp1-1 vs Hp2-2, $p=0,21$) e em relação a eTFG (Hp1-1 vs Hp2-1, $p=0,93$), (Hp2-1 vs Hp2-2, $p=0,59$) e (Hp1-1 vs Hp2-2, $p=0,70$).

Os 91 pacientes foram então estratificados em dois subgrupos, em função da mediana da idade: ≥ 27 anos [Hp1-1 (n=11), Hp2-1 (n=21), Hp2-2 (n=15)] e < 27 anos de idade [Hp1-1 (n=15), Hp2-1 (n=16), Hp2-2 (n=13)]. Os dados obtidos com essa classificação mostraram que pacientes com idade ≥ 27 anos e com o genótipo Hp2-2 apresentaram menor concentração plasmática de creatinina do que pacientes do mesmo subgrupo com o genótipo Hp1-1 ($p=0,01$). Como consequência, foi observada uma tendência à filtração glomerular mais elevada nos pacientes com o genótipo Hp2-2 quando comparados aos pacientes com genótipo Hp1-1 ($p=0,08$) (Figura 20). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos de Hp no subgrupo de pacientes com idade inferior a 27 anos (Figura 21).

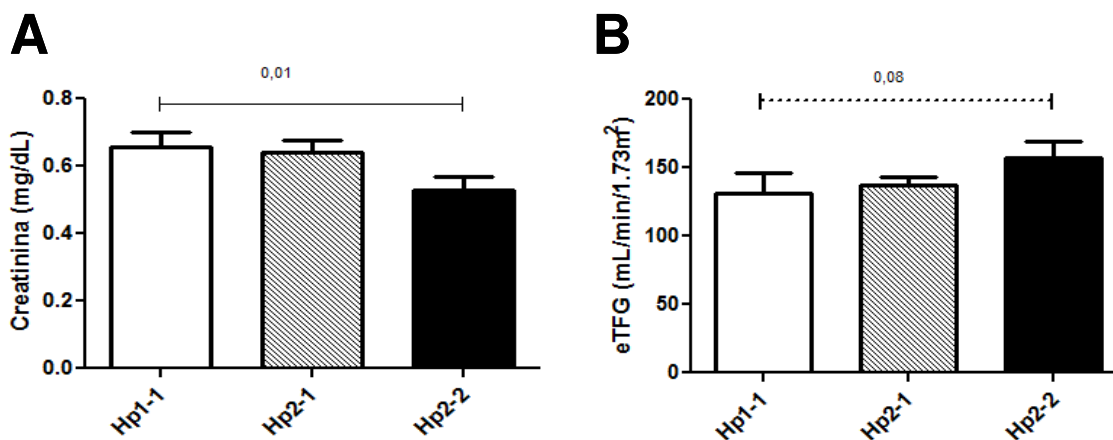


Figura 20: Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL) (A) e a eTFG (mL/min/1,73m²) (B) no subgrupo de pacientes com AF (≥ 27 anos) de acordo com os genótipos da Hp. O eixo X representa os genótipos de Hp e o eixo Y, a dosagem de creatinina (A) (Teste de Kruskal-Wallis - $p=0,053$, $n=47$) a eTFG (B) (Teste de Kruskal-Wallis - $p=0,15$, $n=47$). Os valores estão representados pela média \pm EPM. Teste de Mann-Whitney em relação a Creatinina (Hp1-1 vs Hp2-1, $p=1,0$), (Hp2-1 vs Hp2-2, $p=0,058$) e (Hp1-1 vs Hp2-2, $p=0,01$) e em relação a eTFG (Hp1-1 vs Hp2-1, $p=0,32$), (Hp2-1 vs Hp2-2, $p=0,19$) e (Hp1-1 vs Hp2-2, $p=0,08$).

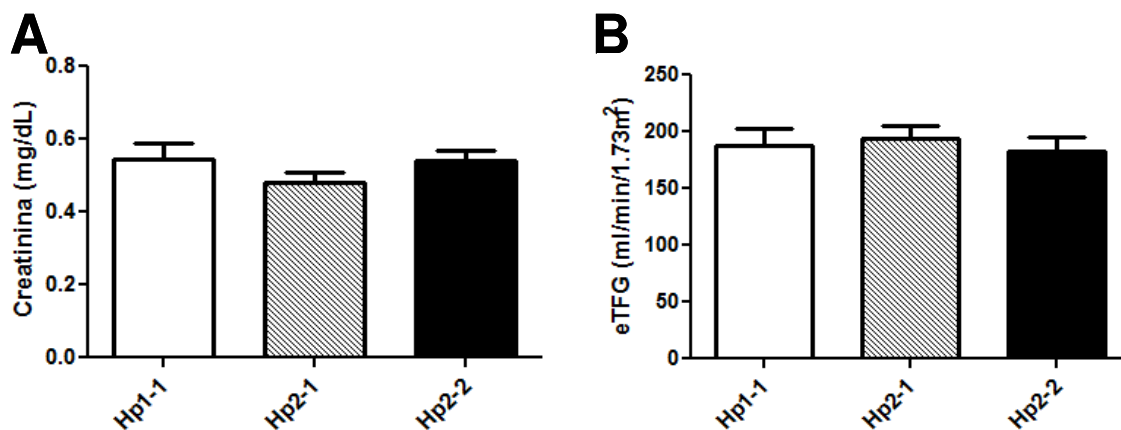


Figura 21: Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL) (A) e a eTFG (mL/min/1,73m²) (B), no subgrupo de pacientes com AF (< 27 anos) de acordo com o genótipo da Hp. O eixo X representa os genótipos de Hp e o eixo Y a dosagem de creatinina (A) (Teste de Kruskal-Wallis - p=0,29, n=44) e eTFG (B) (Teste de Kruskal-Wallis - p=0,58, n=44). Os valores são representados pela média ± EPM. Teste de Mann-Whitney em relação a Creatinina (Hp1-1 vs Hp2-1, p=0,30), (Hp2-1 vs Hp2-2, p=0,13) e (Hp1-1 vs Hp2-2, p=0,67) e em relação a eTFG (Hp1-1 vs Hp2-1, p=0,51), (Hp2-1 vs Hp2-2, p=0,34) e (Hp1-1 vs Hp2-2, p=0,67).

4.10 Evento clínico úlceras de perna *versus* parâmetros avaliados

O histórico de úlceras de perna registrado no prontuário médico dos pacientes foi computado nessa análise. Observou-se que 73 pacientes não relatavam essa complicação, enquanto no prontuário de 19 pacientes havia o registro desse evento clínico em algum momento de suas vidas. A presença de úlcera bilateral foi considerada como evento único. A comparação dos pacientes com e sem o histórico de úlceras de perna em função dos parâmetros avaliados está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12: Comparação dos marcadores avaliados entre os pacientes sem e com o histórico de úlceras de perna.

Marcadores	Sem histórico de úlceras de perna (n=73)	Com histórico de úlceras de perna (n=19)	p-valor
Idade	28,44±9,04	33,11±9,42	0,037
Il-1 β (pg/mL)	1,16±2,35	0,95±1,36	0,61
IL-6 (pg/mL)	4,37±4,89	4,27±2,48	0,33
IL-8 (pg/mL)	7,68±7,26	23,77±43,16	0,0039
TNF- α (pg/mL)	2,10±2,24	1,54±1,03	0,31
CRP (mg/dL)	0,74±0,94	0,83±0,64	0,049
Il-1 β (UA)	0,34±0,67	0,36±0,66	0,77
IL-6 (UA)	0,28±0,59	0,24±0,56	0,74
IL-8 (UA)	0,87±2,33	0,66±1,19	0,85
IL-10 (UA)	0,68±1,10	0,46±0,45	0,80
TNF- α (UA)	0,35±0,59	0,39±0,38	0,17
HP (UA)	0,43±0,72	0,42±0,53	0,77
miR-155 (UA)	0,55±0,29	0,60±0,36	0,79
sVCAM-1 (ng/mL)	1179,49±638,35	1293,99±668,67	0,43
sICAM-1 (ng/mL)	252,09±118,46	340,01±225,34	0,23
sL-selectina (ng/mL)	1403,90±345,51	1350,63±275,72	0,50
FvW:Ag (%)	176,19±74,57	213,28±93,60	0,15
Dímeros-D (ng/mL)	1760,35±1230,29	2387,60±1926,05	0,20
Reticulócitos (%)	8,36±4,08	11,84±4,58	0,009

A média de idade foi, significativamente, maior nos pacientes que apresentaram o histórico (33,11 vs 28,4 p=0,037). Similarmente, outros parâmetros avaliados também foram maiores em pacientes com o histórico de úlcera, dentre eles: dosagem de IL-8 (23,78 vs 7,68 p=0,004), contagem de reticulócitos (11,84 vs 8,36 p=0,009) e dosagem da CRP (0,83 vs 0,74 p=0,049) (Figura 22).

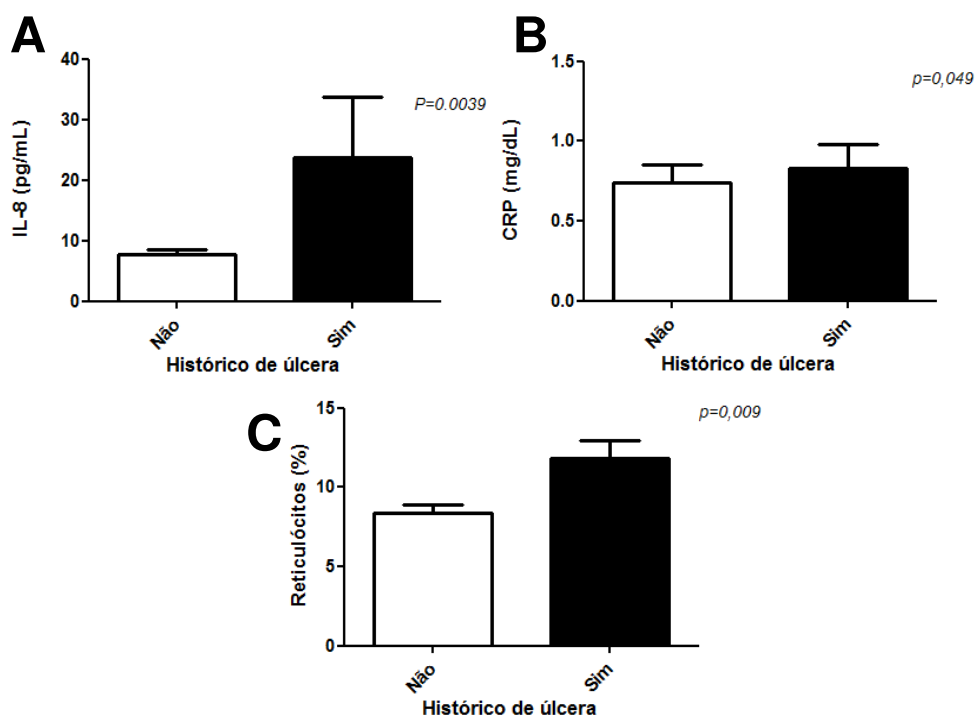


Figura 22: Dosagens da IL-8 (A), CRP (B) e a contagem de reticulócitos (C), em pacientes com AF de acordo com o genótipo da Hp. O eixo X representa os genótipos de Hp e o eixo Y a dosagem da IL-8 (pg/mL) (Teste de Mann-Whitney, p=0,003), o nível sérico da CRP (mg/L) (Teste de Mann-Whitney, p=0,049) e a contagem de reticulócitos (%) (Teste de Mann-Whitney, p=0,009). Os valores são representados pela média \pm EPM.

Com relação aos genótipos da Hp, não foi identificada associação estatística entre esse evento clínico e um genótipo específico ($p=0,6$), embora, em valores percentuais, a úlcera de perna estivesse mais presente em pacientes com o genótipo Hp2-2 do que nos demais (Tabela 13).

Tabela 13: Distribuição dos pacientes que apresentaram ou não histórico de úlcera de perna entre os genótipos da Hp.

Úlcera de perna	Genótipos Hp				p-valor
	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2	Total	
Sem histórico	23 (85,2%)	29 (78,4%)	21 (75,0%)	73 (79,3%)	0,636
Com histórico	4 (14,8%)	8 (21,6%)	7 (25,0%)	19 (20,7%)	

A regressão logística utiliza como medida de efeito a razão de chances e não a razão de prevalências ou de incidências, medidas naturais de estudos transversais e longitudinais. Dessa forma, a regressão de Cox pode ser utilizada como alternativa para estimar a razão de prevalências em estudos transversais. Assim, os dados, com exceção apenas da contagem de reticulócitos obtida somente de 75 pacientes, foram tratados pelo método da regressão de Cox univariada e somente o nível de IL-8 se mostrou estatisticamente significativo, revelando-se fator de risco independente para a presença do histórico de úlcera de perna. Além disso, a dosagem de IL-8 continuou significativa no modelo múltiplo, após a aplicação da seleção *stepwise* [$p=0,01$; Risco: 1,01; IC (95%): 1,00-1,02]. A Tabela 14 resume esses resultados.

Tabela 14: Regressão de Cox univariada para os fatores associados à presença do histórico de úlcera de perna.

Variável	p-valor	Risco	IC (95%)
Idade	0,08	1,04	0,99-1,08
IL-8	0,02	1,01	1,00-1,02
CRP	0,72	1,08	0,69-1,70

IC: Intervalo de Confiança.

4.11 Correlações entre os genótipos da Hp, as características clínicas, os dados laboratoriais, as dosagens plasmáticas/séricas e as expressões gênicas

Os genótipos da Hp, os eventos clínicos, os dados laboratoriais, assim como as dosagens plasmáticas/séricas e as expressões gênicas dos marcadores analisados foram correlacionados em busca de uma possível associação entre os parâmetros estudados. O coeficiente de correlação linear de Spearman (R) foi utilizado para verificar se existe relação linear entre as dosagens plasmáticas/séricas, as expressões gênicas e os dados laboratoriais e aferir a sua força. Assim, quanto mais próximo de -1 ou 1 for o R, maior será a força dessa relação. Tendo em vista a quantidade expressiva de correlações encontradas (59 correlações), as quais incluem várias de intensidades fracas, serão mostradas na Tabela 15 aquelas que apresentaram os coeficientes de correlação mais elevados ($R > 0,5$).

Tabela 15: Coeficientes de correlação linear de Spearman relacionando as dosagens plasmáticas/séricas, expressões gênicas e os parâmetros laboratoriais.

IL-1 β (UA)	IL-6 (UA)	IL-8 (UA)	IL-10 (UA)	TNF- α (UA)
R	0,869	0,895	0,702	0,584
p valor	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
n	89	89	89	89

IL-6 (UA)	IL-8 (UA)	IL-10 (UA)
R	0,818	0,716
p valor	< 0,001	< 0,001
n	89	89

IL-8 (UA)	IL-10 (UA)	TNF- α (UA)
R	0,690	0,518
p valor	< 0,001	< 0,001
n	89	89

4.12 Polimorfismo do gene CCR5 Δ 32

A pesquisa da deleção CCR5 Δ 32 foi concluída nos 92 pacientes. Quatro pacientes (4,34%) eram heterozigotos da deleção CCR5 Δ 32, enquanto 88 (95,66%) apresentaram o genótipo normal. O número de pacientes heterozigotos é muito restrito para se efetuarem análises estatísticas confiáveis.

5. DISCUSSÃO

A AF representa a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, distribuindo-se de forma heterogênea e sendo mais frequente em populações onde a proporção de antepassados negros é predominante, como a região nordeste que recebeu o maior fluxo migratório de escravos africanos (Cançado & Jesus, 2007). O Hospital do Hemope é um dos centros de referência para o diagnóstico e tratamento dessa condição clínica, onde atualmente são acompanhados cerca 1300 pacientes. Por outro lado, o Laboratório de Hemoglobinopatias da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp é um centro de referência em pesquisas relacionadas às alterações estruturais e funcionais da Hb, e dessa forma, a colaboração firmada entre essas duas instituições representa uma grande contribuição no esclarecimento da diversidade fenotípica encontrada nessa doença.

Para a realização deste trabalho, os grupos de estudo foram compostos por pacientes com AF genotipados previamente para Hp (Santos et al., 2011); vale ressaltar que os pacientes selecionados, de acordo com o genótipo da Hp, estavam clinicamente estáveis, sem necessidade transfusional, por pelo menos três meses, e sem uso de hidroxiureia, droga de potencial anti-inflamatório que certamente alteraria os resultados das variáveis em análise. Assim, os pacientes foram distribuídos de forma homogênea entre os diferentes grupos, com relação à idade e ao gênero.

Vários estudos têm demonstrado a importância dos haplótipo β^S , dos níveis elevados de HbF e da presença de talassemia α na modulação da gravidade das DF, mas há consenso de que outros moduladores, genéticos e ambientais, também estejam envolvidos (Steinberg, 2006; Higgs & Wood, 2008; Lettre et al., 2008). Polimorfismos em outros genes que não os globínicos têm surgido como candidatos a moduladores fenotípicos nas

DF (Kutlar, 2005), entre estes, encontra-se os da Hp, proteína com capacidade de ligar-se à Hb livre no plasma, prevenindo os danos oxidativos causados pelo heme (Hughes et al., 2005, Santos et al., 2011). O polimorfismo da Hp tem sido associado à suscetibilidade e evolução clínica em diversas doenças, como a nefropatia e a retinopatia diabética (Nakhoul et al., 2000; Nakhoul et al., 2001; Bessa et al., 2007), no entanto, os resultados não são homogêneos e parecem variar de população para população (Koda et al., 2002; Wobeto et al., 2007).

No presente estudo, cujo objetivo geral foi avaliar se os genótipos da Hp poderiam influenciar o estado inflamatório na AF através da comparação dos níveis de determinados parâmetros a ele relacionados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos da Hp quando comparados os níveis plasmáticos/séricos das citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), da quimiocina (IL-8), das moléculas de adesão (sVCAM-1, sICAM-1 e sL-Selectina) e da CRP, e tampouco da expressão gênica de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , HP e miR-155. Esses dados não corroboram achados *in vitro*, o que sugere o envolvimento de outros mecanismos compensatórios *in vivo*. Quanto à IL-8, foi possível observar níveis aumentados dessa quimiocina nos pacientes com o genótipo Hp2-2 em relação aos demais, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Estudos futuros, avaliando a influência do polimorfismo da Hp em pacientes com AF durante episódios de crises hemolíticas talvez possam contribuir para o esclarecimento dessa possível modulação da resposta inflamatória na AF.

Com relação ao miR-155, dados parciais apresentados por nós no *American Society For Cell Biology Congress – ASCB 2012* mostraram que a taxa de expressão do miR-155 em polimorfonucleares de pacientes com o genótipo Hp1-1 foi maior do que a observada

com o genótipo Hp2-1, o que por sua vez, foi maior do que em pacientes com o genótipo Hp2-2 (12 pacientes/genótipo) (Santos et al., 2012). Sabe-se que o miR-155 está envolvido na resposta inflamatória de células mielóides e pode regular a expressão do SHIP-1, um inibidor da inflamação, e conseqüentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α . De acordo com estes resultados parciais sugere-se uma relação entre o miR-155 com o genótipo da Hp, o qual poderia desempenhar papel relevante na resposta inflamatória em pacientes AF. Entretanto, é interessante destacar que não houve diferença significativa na expressão do miR-155 em células mononucleares (n=92), que apresentam maior envolvimento na produção de citocinas, apresentando, inclusive, inversão no perfil de expressão desse miRNA entre os genótipos da Hp em relação ao obtido com polimorfonucleares em 36 pacientes.

A investigação da associação do polimorfismo da Hp com as DF é pouco explorada na literatura. Ostrowski et al., em 1987, avaliaram 18 pacientes HbSS e HbS/ β -talassemia e, em estudo posterior (Ostrowski et al., 1988), 10 pacientes HbSC. Nesses estudos, as frequências do fenótipo Hp1-1 foram de 72% e 90%, respectivamente. Os pesquisadores sugeriram duas hipóteses: (1) o fenótipo Hp1-1 poderia conferir vantagem a esses pacientes, pois sua prevalência elevada no grupo indicaria que os demais fenótipos estariam associados ao pior prognóstico, ou (2) ao contrário, esse fenótipo estaria associado a uma desvantagem durante os episódios hemolíticos, levando ao aumento no número de pacientes Hp1-1 no atendimento ambulatorial.

Em 2005, Hughes et al. avaliaram o genótipo da Hp em dois grupos de pacientes com DF, um grupo pediátrico (n=21) e um grupo adulto (n=41). Eles encontraram

frequência significativamente menor do alelo HP2 no grupo adulto, sugerindo que este alelo sofreria uma seleção desfavorável com o aumento da idade dos pacientes.

Os resultados dos experimentos *in vitro* devem ser interpretados com cautela, uma vez que eles nem sempre representam exatamente o que está acontecendo *in vivo*. Bora et al. (2008), em estudo *in vitro* apresentado no Congresso da Sociedade Americana de Hematologia - ASH 2008, analisaram o perfil de liberação de citocinas em culturas de células mononucleares isoladas de indivíduos controle e paciente com DF, expostas aos complexos Hp-Hb (Hp1-1-HbA, Hp2-2-HbA, Hp1-1-HbS e Hp2-2-HbS). Os resultados evidenciaram maior liberação das citocinas (GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) nas culturas de células, de paciente e controle, expostas aos complexos Hp2-2-HbA / Hp2-2-HbS do que aos complexos Hp-1-1-HbA / Hp1-1-HbS, indicando que a liberação dessas citocinas foi predominantemente relacionada ao tipo de Hp e não ao tipo de Hb. Dessa forma, o fenótipo Hp2-2 resultaria em resposta inflamatória mais pronunciada, sugerindo novo mecanismo pelo qual a hemólise acarretaria efeitos adversos relacionados ao polimorfismo da Hp (Bora et al., 2008).

Em estudo publicado por nosso grupo de pesquisa (2011), a frequência dos genótipos da Hp foi investigada em 775 pacientes com DF, os quais foram divididos em 5 grupos etários. A frequência do genótipo Hp2-2 sempre foi menos representada nos diferentes grupos de pacientes do que o genótipo Hp1-1. Entretanto, esta redução foi mais acentuada quando o grupo V (pacientes com idade \geq 21 anos) foi subdividido em V.a (21 a 30 anos de idade) e V.b (superior a 30 anos) (de 25% para 19,5%, respectivamente). Esses dados sugeriram que com o aumento da idade dos pacientes adultos ocorria uma redução progressiva da frequência do genótipo Hp2-2, contrariamente ao observado nos subgrupos

controles, onde a frequência de Hp2-2 se manteve em 28% (Santos et al., 2011). Embora a magnitude das diferenças observadas não tenha sido suficiente para que o nível de significância fosse atingido, esses achados corroboraram o esperado segundo os estudos *in vitro* que demonstraram eficiências distintas nas atividades das Hp.

Com base nesses resultados, nossa hipótese é de que, embora o fenótipo Hp2-2 esteja comprovadamente relacionado a menor capacidade antioxidativa e a resposta inflamatória mais exacerbada que podem, de fato, contribuir para um pior prognóstico na AF e em outras doenças, *in vivo* outros mecanismos, inerentes aos organismos complexos, estariam compensando os efeitos danosos observados *in vitro*, o que faz com que as diferenças observadas não atinjam significância estatística.

Uma das características marcantes da AF é a variabilidade de manifestações clínicas e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas (Lettre et al., 2008). A AF é caracterizada por várias alterações vasculares que envolvem a disfunção endotelial, leucocitose, ativação de leucócitos e de plaquetas. Essas alterações ocorrem em um contexto de hemólise acentuada, falcização e adesividade das células, e resultam em mudanças no tônus vascular, vaso-oclusão e hipóxia, preparando um ambiente perfeito para a "tempestade vascular" observada (Brittain & Parise, 2007). Embora os relatos da origem do início dessas alterações vasculares sejam intimamente relacionados à falcização dos eritrócitos, as teorias atuais sugerem que estas células sejam capazes de desencadear uma série de reações que conduzem à liberação de fatores plasmáticos e citocinas que medeiam efetivamente essas mudanças e alteram a vasculatura (Brittain & Parise, 2007). A inflamação, a adesão celular ao endotélio vascular e a lesão endotelial podem contribuir de forma significativa com as manifestações clínicas observadas na AF. Embora as alterações no perfil de citocinas e de biomarcadores inflamatórios tenham sido relacionadas com a

doença, alguns relatos são contraditórios e o papel para essas moléculas ainda não foi completamente estabelecido na AF. O melhor conhecimento dessas vias pode contribuir para a compreensão mais ampla da fisiopatologia da AF.

Em nosso estudo, foram também comparadas as concentrações plasmáticas dos marcadores vasculares FvW:Ag e Dímeros-D. Observou-se a diminuição significativa do FvW:Ag no grupo de pacientes com o genótipo Hp2-2 em relação aos demais, independentemente da idade e do grupo sanguíneo ABO. Bernardo et al. (2004) demonstraram que citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-8, podem estimular a liberação dos multímeros de alto peso molecular do FvW a partir de células endoteliais ativadas resultando no seu acúmulo no plasma e na superfície endotelial, o que pode induzir à agregação plaquetária e adesão ao endotélio vascular. Com relação a IL-8, não observamos diferenças significativas entre os grupos, porém os níveis dessa quimiocina foram maiores em pacientes com o genótipo Hp2-2, o que talvez influenciasse o aumento da liberação dos multímeros do FvW de alto peso molecular; esse último, por sua vez, poderia sobrecarregar a capacidade de processamento da ADAMTS13, levando ao acúmulo desses multímeros e resultando em agregação plaquetária e adesão das plaquetas e dos leucócitos ao endotélio vascular. Assim, uma possível explicação estaria relacionada a uma menor atividade de clivagem dos multímeros do FvW pela enzima ADAMTS13 nos pacientes com o genótipo Hp2-2 quando comparados aos demais, uma vez que o genótipo Hp2-2 está relacionado à maior disfunção endotelial em diversas doenças. Por outro lado, os pacientes com o genótipo Hp2-1 e Hp1-1 possivelmente apresentariam uma clivagem mais eficiente do FvW, reduzindo assim o efeito pró-trombótico. Outra hipótese poderia estar relacionada a maior ocupação, pela Hb, do sítio proteolítico da enzima ADAMTS13

nos multímeros do FvW (Zhou et al., 2009) nos pacientes com a proteína Hp2-2, visto que a depuração diminuída do complexo Hp2-2-Hb resulta em sua maior concentração, e isto permite que o complexo Hp-Hb possa se ligar a outras proteínas no plasma e mediar sua modificação funcional e estrutural (Levy et al., 2010). Dessa forma, os pacientes com o genótipo Hp2-2 poderiam apresentar altos níveis de multímeros do FvW e menor nível do FvW:Ag, este último significativamente diminuído quando comparado aos demais genótipos. Estudos adicionais e experimentais poderão investigar melhor as hipóteses postuladas. Quanto à dosagem plasmática dos Dímeros-D, foi observada uma atividade fibrinolítica aumentada em todos os grupos genotípicos, sem, no entanto, associação com um genótipo específico.

Adicionalmente, foi observado que 64,8% dos 91 pacientes apresentavam hiperfiltração glomerular. Esses achados estão em concordância com aqueles obtidos por Haymann et al. (2010), que observaram a prevalência de hiperfiltração, estimada pela mesma fórmula utilizada por nós, em 51% dos 280 pacientes com AF e em 72% de um subgrupo de pacientes com AF (n=48), este último utilizado para comparar diferentes métodos de avaliação da filtração glomerular. Nesse mesmo estudo, cerca de 84% dos pacientes apresentaram nefropatia associada à AF, quando hiperfiltração concomitante a albuminúria ou insuficiência renal foram consideradas como critérios relevantes. Isso significa que a nefropatia associada à AF, embora muitas vezes imperceptível na fase inicial, é uma das complicações crônicas mais frequentes da doença (Haymann et al., 2010). A taxa de filtração glomerular parece estar diretamente relacionada ao débito cardíaco e regulação anormal do tônus vascular, o que pode elevar o fluxo sanguíneo intrarrenal, diminuir a biodisponibilidade do NO e provocar a ativação anormal do endotélio. Dessa forma, a hemólise intravascular, que é responsável pela redução da

biodisponibilidade do NO, poderia estar mais intimamente relacionada a hiperfiltração glomerular (Haymann et al., 2010).

A nefropatia é uma complicação comum na AF representando uma causa importante de mortalidade em pacientes adultos (Platt et al., 1994). Sabe-se que desde a infância esses pacientes estão sujeitos à insuficiência renal, como consequência da anemia crônica, fluxo sanguíneo aumentado e eventos de veno-oclusão intraparenquimatoso. A hiperfiltração glomerular parece ser um dos primeiros indícios do surgimento da nefropatia na AF, assim como na nefropatia associada à DM tipo I; essa hiperfiltração é característica comum em pacientes adulto-jovens com AF (Barros et al., 2006; Haymann et al., 2010). A eTFG aumentada pode ser identificada desde os primeiros anos de vida em crianças com AF, predizendo uma disfunção renal precoce (Wigfall et al., 2000; Wesson, 2002). O rim desse paciente é afetado tanto por alterações hemodinâmicas crônicas quanto em consequência da vaso-oclusão no interior da medula renal e as anormalidades na estrutura e na função renal ocorrem com o aumento da idade (Emokpae & Uadia, 2012). O aumento do estresse oxidativo é considerado um mecanismo patogênico importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e vasculares periféricas e os pacientes com AF são suscetíveis a esse processo devido à hemólise observada, uma vez que a Hb livre atua como um catalisador poderoso para iniciar a reação peroxidativa. Além disso, anormalidades metabólicas, inflamação e isquemia também podem aumentar o estresse oxidativo na nefropatia falciforme (Emokpae & Uadia, 2012).

Em nosso trabalho não houve diferenças significativas entre as dosagens de creatinina e a eTFG com os genótipos da Hp. Entretanto, quando os pacientes foram estratificados em dois subgrupos, de acordo com a mediana da idade (27 anos), observou-se que o nível plasmático de creatinina foi significativamente menor nos pacientes acima de

27 anos e com genótipo Hp2-2 ($p=0,01$), o que se refletiu em tendência à filtração glomerular aumentada ($p=0,08$). Essa tendência pode ser presumível, pois a variação na capacidade oxidativa da Hp não foi atribuída às diferenças de afinidade entre os seus subtipos à molécula de Hb, mas refletia o fato de que o complexo Hp2-2-Hb, devido a seu maior tamanho e estrutura, atravessaria com maior dificuldade e maior tempo a barreira endotelial para alcançar os espaços extravasculares quando comparado aos demais complexos (Levy et al., 2000; Nakhoul et al., 2001; Levy et al., 2002; Asleh et al., 2003). Assim, pacientes com esse genótipo poderiam estar mais expostos aos eventos oxidativos quando comparados àqueles com genótipos Hp2-1 e Hp1-1, o que poderia resultar em alterações estruturais significativas no parênquima renal, contribuindo para desenvolvimento de insuficiência renal. Como os resultados aqui obtidos sugerem que os genótipos de Hp possam associar-se a hiperfiltração glomerular com o aumento da idade, para uma próxima etapa de investigação, esse parâmetro específico poderá ser estudado em amostra mais representativa da população e com a utilização do *clearance* do Cr-EDTA que representa o padrão-ouro para avaliação da função renal. Além disso, estudos experimentais serão particularmente importantes nesse contexto.

A importância dos genótipos da Hp na progressão de doenças tem sido relatada na *diabetes mellitus* (DM), em doenças vasculares, em doenças autoimunes e em muitas doenças inflamatórias (Quaye, 2008). O aumento do estresse oxidativo em pacientes diabéticos resulta na oxidação da glicose e na modificação de lipoproteínas. Essas alterações podem estimular a produção de citocinas inflamatórias que têm sido relatadas nas alterações morfológicas e patológicas encontradas nas complicações macrovasculares e microvasculares (Giugliano & Ceriello, 1996; Levy, 2003). Diferentes graus de suscetibilidade ao desenvolvimento de problemas vasculares foram observados em estudos

que avaliaram as propriedades antioxidantes da Hp em pacientes diabéticos, nos quais indivíduos com o genótipo Hp1-1 apresentaram melhor proteção contra as complicações vasculares da DM do que os indivíduos com os genótipos Hp2-1 e Hp2-2. Em 2008, Asleh et al. propuseram que pacientes diabéticos com o genótipo Hp2-2 apresentavam oxidação do HDL como resultado dessa dificuldade na sua remoção dos vasos, e a ligação aumentada do complexo Hp2-2-Hb ao HDL era devido a sua avidéz pela lipoproteína e a concentração plasmática mais elevada. Esse complexo, quando ligado ao HDL, pode produzir ROS que são capazes de oxidar proteínas, componentes lipídicos de HDL e torná-lo não funcional, alterando assim o transporte reverso do colesterol. A propriedade da Hb associada ao HDL em sequestrar o NO nos indivíduos diabéticos Hp2-2 pode ter significado clínico de importância mais acentuada do que o efeito no transporte do colesterol. Dessa forma, o HDL nesses indivíduos pode, de fato, ser pró-inflamatório e pró-trombótico pela limitação da biodisponibilidade do NO (Asleh et al., 2008).

O fenótipo Hp2-2 também foi associado às complicações microvasculares em ambos os tipos de DM (Nakhoul et al., 2007). Em 2000, Nakhoul et al. constataram que o fenótipo Hp2-2 estava demasiadamente representado em pacientes israelenses com DM tipo 1 com retinopatia diabética, enquanto que pacientes com DM do tipo 1 e 2 com o fenótipo Hp1-1 apresentaram relativa proteção contra nefropatia diabética (Nakhoul et al., 2001). Resultados semelhantes foram relatados por Bessa et al. (2007) para pacientes egípcios com DM tipo 2. Entretanto, outros estudos têm reportado resultados contraditórios, como o observado por Koda et al. (2002) que não conseguiram detectar efeito protetor do alelo HP1 em pacientes japoneses com DM tipo 2. Uma explicação razoável pode estar relacionada com o tempo de evolução, tipo de doença e maior exposição ao estresse oxidativo. Dessa forma, de acordo com as características fenotípicas, surgiu a hipótese de que o complexo

Hp-Hb de pacientes com genótipo Hp2-2 estaria sujeito a maior estresse oxidativo, o que poderia contribuir com manifestações clínicas mais graves em doenças que apresentam componentes significativos de lesões vasculares (Koda et al., 1998; Melamed-Frank et al., 2001).

Outra investigação realizada nesse estudo foi correlacionar os genótipos da Hp com dados clínicos dos pacientes. Dentre as manifestações clínicas apresentadas nos prontuários médicos dos pacientes, avaliamos somente a úlcera de perna por razões citadas anteriormente. A prevalência desse evento dentro dos três grupos genotípicos foi de 25,0% (Hp2-2), 21,6% (Hp2-1) e 14,8% (Hp1-1), sem diferença significativa ($p=0,6$). Entretanto, ao correlacionar esse evento clínico com outras variáveis foram observados níveis significativamente aumentados de IL-8, CRP e contagem de reticulócitos em pacientes que tinham histórico de úlceras de perna.

A úlcera de perna é uma complicação debilitante da AF; está associada ao aumento da morbidade e cerca de 10% desses pacientes desenvolvem essa manifestação clínica entre 10 e 50 anos de idade (Koshy et al., 1989; Minniti et al., 2011). Por outro lado, esse evento clínico tem baixa prevalência nos pacientes com idade inferior a 10 anos e em outros genótipos das DF (Koshy et al., 1989; Minniti et al., 2011). Além disso, a localização geográfica parece exercer forte influência na prevalência das úlceras de perna, como observado em estudo realizado na Jamaica por Serjeant, em 1974, que relatou a prevalência de 75% dessa complicação em pacientes com AF, diferente dos valores encontrados em populações dos Estados Unidos (2,5%) e da África (1,5-13,5%) (Koshy et al., 1989; Nolan et al., 2006).

Os avanços no entendimento da fisiopatologia e no tratamento das úlceras de perna têm acontecido de forma lenta. A patogênese das úlceras crônicas nas DF é um processo

pouco conhecido e bastante complexo e os eventos como a obstrução mecânica pelas células falciformes densas, incompetência venosa, infecções bacterianas, controle autônomo anormal com vasoconstrição excessiva, trombose microvascular, anemia com diminuição na capacidade carreadora de oxigênio e diminuição da biodisponibilidade do NO levando à função endotelial prejudicada, têm sido propostos como fatores potenciais que contribuem nesse processo (Mack & Kato, 2006). Estudos venográficos têm demonstrado que a insuficiência venosa não é a causa primária das ulcerações na AF. Em vez disso, o *shunt* arteriovenoso tem sido postulado como um fator na formação da úlcera, uma vez que, priva a pele de oxigênio e dessa forma, promove a ulceração. Além disso, trauma, infecção e inflamação também foram citados como potenciais causas de úlceras de membros inferiores na AF. É a combinação desses fatores, juntamente com a microcirculação interrompida, que contribuem para a fisiopatologia das úlceras de membros inferiores em pacientes com AF (Minniti et al., 2010).

Esse evento clínico está associado ao grau de hemólise, uma vez que a incidência é reduzida em pacientes que apresentam concomitância com a talassemia α , maiores concentrações de Hb total e naqueles com níveis elevados de HbF (Koshy et al., 1989). Além disso, as úlceras de perna têm sido relatadas mais comumente em portadores do haplótipo CAR para o cluster da globina β^S (Minniti et al., 2010). Pacientes com úlcera de perna possuem risco aumentado de desenvolver complicações graves das DF, tais como a hipertensão pulmonar, priapismo e, possivelmente, doença renal (Minniti et al., 2011).

Em nosso estudo encontramos associação positiva entre o histórico de úlceras de perna e idade mais avançada dos pacientes (28,4 vs 33,11 $p=0,037$), contudo, quando retiramos a influência de outros parâmetros estudados, a idade avançada não se revelou

como fator de risco para o histórico desse evento. Os nossos dados corroboram os achados de Minnit et al. (2011), em uma coorte de cerca de 505 pacientes com DF, que mostrou relação positiva para idade e a ocorrência de úlceras de perna. Adicionalmente, os níveis de IL-8, CRP e da contagem dos reticulócitos mostraram-se aumentados nos pacientes que apresentaram o histórico de úlceras de perna em algum momento de suas vidas o que demonstra uma associação entre esses fatores com a prevalência dessa manifestação clínica. Nesse estudo, a associação da contagem dos reticulócitos foi similar àquela reportada por Minnit et al. (2011). A CRP, uma proteína de fase aguda positiva, é utilizada como um marcador de inflamação sistêmica (Raman et al., 2012), sendo também vista por muitos como um marcador de inflamação vascular (Armani & Becker, 2005). Um dos efeitos pró-inflamatórios da CRP incluem a indução de citocinas inflamatórias e do fator tecidual em monócitos, além de ter sido relatada com um efeito procoagulante (Ramamoorthy et al., 2012). No presente trabalho, encontramos valores basais discretamente elevados em pacientes com o histórico de úlcera de perna quando comparados aos pacientes sem o histórico. A quimiocina IL-8 é um potente mediador da quimiotaxia de neutrófilos, e níveis elevados dessa quimiocina foram associados com algumas doenças classicamente ulcerativas, como o Pioderma Gangrenoso e a Colite Ulcerativa (Pukstad et al., 2010). No estudo de Peral et al., em 2009, foram observados altos níveis de IL-8 em tecido de úlceras de pacientes diabéticos em comparação com o grupo controle sem úlcera, sugerindo que níveis aumentados dessa quimiocina estejam relacionados com o desenvolvimento dessa manifestação clínica. Assim, nossos achados indicaram a associação entre o histórico de úlceras de perna e os níveis de CRP e IL-8, os quais se mostraram aumentados nos pacientes que tinham relatos desse evento clínico. Interessantemente, o nível de IL-8, bem

como, a prevalência do histórico de úlceras de perna foram maiores nos pacientes com genótipo Hp2-2 do que nos demais, sem, no entanto, alcançarem significância.

O receptor de quimiocinas CCR5 é principalmente encontrado em células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos T, e desempenha um papel importante na migração dessas células para os sítios inflamatórios, direcionando preferencialmente, a uma resposta imune Th1. Como essa resposta está associada à inflamação, foi proposto que a presença do alelo CCR5 Δ 32, não funcional, poderia conferir maior vantagem aos pacientes com AF por implicar em resposta Th1 menos eficiente.

Em nossa casuística, não identificamos homozigotos do alelo CCR5 Δ 32 e o número de heterozigotos foi pequeno [n = 4 (4,34%)], o que é característica esperada uma vez que esta mutação é de origem européia. Devido à baixa frequência desse alelo, não foi possível estabelecer uma comparação entre os grupos de pacientes e relacioná-los a uma possível vantagem quanto à diminuição nos níveis das citocinas inflamatórias.

A compreensão do papel das citocinas, quimiocinas e dos marcadores de disfunção vascular como vetores de inflamação pode ser de fundamental importância para o melhor entendimento da variabilidade fenotípica observada nos pacientes com AF e na busca de novas terapias para o seu tratamento (Brittain & Parise, 2007). Sabe-se que a variabilidade fenotípica observada pode ser explicada, em parte, por fatores biológicos, como as bases genéticas e a influência ambiental e que quando combinados a outras influências, podem contribuir para a heterogeneidade clínica. Dessa forma, com base nos resultados obtidos, e no tamanho amostral aqui analisado, não se pôde observar a influência, *in vivo*, dos genótipos da Hp sobre alguns aspectos inflamatórios em pacientes com AF, porém não se pode excluir a possibilidade de que pacientes com o

genótipo/fenótipo Hp2-2 possam sofrer uma desvantagem seletiva, uma vez que determinados dados corroboram a hipótese de uma possível modulação da gravidade clínica da AF relacionada ao polimorfismo da Hp, como a associação do genótipo Hp2-2 aos níveis diminuídos do FvW:Ag, que poderia estar relacionada à clivagem menos eficiente do FvW, favorecendo, assim, o efeito pró-trombótico nesses pacientes. Ainda, a tendência à hiperfiltração apresentada por pacientes Hp2-2 à medida em que a idade aumenta. Embora o critério utilizado nesse estudo para seleção dos pacientes tenha sido o genótipo da Hp, não podemos excluir a possibilidade de vieses que interferiram na representatividade dessa amostra em relação à população total de pacientes.

6. CONCLUSÕES

- Os níveis plasmáticos/séricos dos mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α), da CRP e das moléculas de adesão sVCAM-1, sICAM-1 e sL-selectina não diferiram significativamente entre pacientes com AF portadores de diferentes genótipos de Hp;
- Diferenças significativas também não foram detectadas nas taxas de expressão gênica dos mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) e do mediador anti-inflamatório (IL-10) entre os diferentes genótipos da Hp;
- A concentração plasmática do FvW:Ag foi significativamente menor nos pacientes com o genótipo Hp2-2, sugerindo assim, possível influência do genótipo da Hp no processamento indireto dos multímeros do FvW. Em contrapartida, os níveis dos Dímeros-D não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos da Hp;
- As taxas de expressão gênica da HP e do miR-155, em células mononucleares, não apresentaram diferenças entre os genótipos da Hp, enquanto que em estudo preliminar, a expressão do miR-155 encontrou-se significativamente diminuída em polimorfonucleares de pacientes com o genótipo Hp2-2;
- A hiperfiltração glomerular foi detectada em 59 dos 91 pacientes com AF (64,8%), não se constatando associação significativa com os genótipos da Hp. No subgrupo de pacientes com o genótipo Hp2-2 e com idade igual ou superior à mediana de 27 anos observou-se níveis plasmáticos de creatinina significativamente diminuídos;
- Em pacientes que apresentaram histórico de úlceras de perna em algum momento de suas vidas, observou-se uma elevação dos níveis de IL-8 e CRP e da contagem

dos reticulócitos no modelo univariado; no multivariado apenas a IL-8 foi estatisticamente significativo;

- A deleção de 32 pb no gene CCR5 foi identificada, em heterozigose, em apenas 4 pacientes (4,34%), o que impossibilitou tratamento estatístico adequado.

De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo no Brasil que comparou alguns dos importantes aspectos inflamatórios da AF, procurando associá-los aos três diferentes genótipos da Hp. Os resultados não permitiram concluir que esses genótipos podem modular a resposta inflamatória dos pacientes aqui estudados. Não obstante, pelas tendências observadas em algumas das comparações feitas, também não se deve excluir a possibilidade de que o polimorfismo da Hp pode, combinado a outros fatores genéticos e ambientais, contribuir para a diversidade clínica observada nessa doença. Estudos de aspectos e fatores isolados em amostras de tamanhos mais representativos das populações, bem como análises experimentais poderão contribuir para esclarecer aspectos relevantes do comportamento clínico de pacientes com AF.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeyoku AB, Olujohungbe AB, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, et al. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. *BJU Int* 2002; 90:898-902.

Ahmed S, Siddiqui AK, Iqbal U, Sison CP, Shahid RK, Sheth M, et al. Effect of low-dose warfarin on D-dimer levels during sickle cell vaso-occlusive crisis: a brief report. *Eur J Haematol* 2004; 72:213-6.

Anderson DR, Wells PS. D-dimer for the diagnosis of venous thromboembolism. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:296-301.

Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ, Kazazian HH Jr. 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: 853-6.

Archer DR, Stiles JK, Newman GW, Quarshie A, Hsu LL, Sayavongsa P, et al. C-reactive protein and interleukin-6 are decreased in transgenic sickle cell mice fed a high protein diet. *J Nutr* 2008; 138:1148-52.

Armani A, Becker RC. The biology, utilization, and attenuation of C-reactive protein in cardiovascular disease: part II. *Am Heart J.* 2005; 149:977-83.

Arredouani M, Matthijs P, Hoeyveld V, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL. Haptoglobin directly affects cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunol* 2003; 108:144-51.

Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 2003; 92:1193-200.

Asleh R, Levy AP. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1:19-28.

Asleh R, Blum S, Kalet-Litman S, Alshiek J, Miller-Lotan R, Asaf R, et al. Correction of HDL dysfunction in individuals with diabetes and the haptoglobin 2-2 genotype. *Diabetes* 2008; 57:2794-800.

Azarov I, He X, Jeffers A, Basu S, Ucer B, Hantagan RR, et al. Rate of nitric oxide scavenging by hemoglobin bound to haptoglobin. *Nitric Oxide* 2008; 18:296-302.

Ballas SK, Talacki CA, Adachi K, Schwartz E, Surrey S, Rappaport E. The Xmn I site (-158, C-T) 5' to the G gamma gene: correlation with the Senegalese haplotype and G t globin expression. *Hemoglobin* 1991; 15:393-405.

Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012:949535.

Barros FB, Lima CS, Santos AO, et al: 51Cr-EDTA measurements of the glomerular filtration rate in patients with sickle cell anaemia and minor renal damage. *Nucl Med Commun* 2006; 27:959-62.

Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000; 96:2451-9.

Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 2004; 104:100-6.

Bessa SS, Hamdy SM, Ali EM. Haptoglobin gene polymorphism in type 2 diabetic patients with and without nephropathy: An Egyptian study. *Eur J Intern Med* 2007; 18: 489-95.

Blahna MT, Hata A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Lett* 2012 ;586:1906-12.

Bora K, Natarajan K, Kutlar F, Zhang H, Xu H, Clair B, et al. In vitro exploratory studies of haptoglobin polymorphism and their effect on cytokine release from cultured

mononuclear cells in sickle cell disease. In: 50th ASH Annual Meeting 2008, Blood Suppl; v. 112, Abstract 1441.

Brittain JE, Parise LV. Cytokines and plasma factors in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 2007; 14:438-43.

Brown MD, Wick TM, Eckman JR. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. *Pediatr Pathol Mol Med* 2001; 20:47-72.

Brugnara C. Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 927-33.

Bunn HF, Forget BG. Molecular, genetic and clinical aspects. In: Hemoglobin. 1. ed. W.B. Saunders Company, 1986, p.690.

Cançado RD, Jesus JA. Sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29:204-6.

Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* 2007; 29:92-110.

Chen J, Hobbs WE, Le J, Lenting PJ, de Groot PG, López J. The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of active von Willebrand factor in the plasma. *Blood* 2011; 117:3680-3.

Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One* 2008;3:e2360.

Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; 19:771-84.

Chies JAB, Hutz MH. High frequency of the CCR5 Δ 32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:71-5.

Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66:43-50.

Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical biochemistry* 2009; 42:1824-38.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8:467-77

Dacie JV, Lewis SM. *Hematologia Prática de Dacie e Lewis*, 9a. ed., Artmed, Porto Alegre, 2006.

Davis L, Dibner MD, Battey JF. *Basis Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60-8.

Dennis C. Haemoglobin scavenger. *Nature* 2001; 409:141-3.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34:392-401.

Emokpae MA, Uadia PO. Association of oxidative stress markers with atherogenic index of plasma in adult sickle cell nephropathy. *Anemia.* 2012; 2012:767501.

Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet* 2008; 74:296-306.

Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792:497-505.

Fertrin KY, Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert review of hematology* 2010; 3:443-58.

Finnegan EM, Barabino GA, Liu XD, Chang HY, Jonczyk A, Kaul DK. Small-molecule cyclic alpha V beta 3 antagonists inhibit sickle red cell adhesion to vascular endothelium and vasoocclusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293:H1038-45.

Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* 2002; 9:101-6.

Frenette PS. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation* 2004; 11:167-77.

Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19:247-63.

Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, et al. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation* 2003; 107:271-8.

Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev SOCERJ*. 2009; 22:398-403.

Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, et al. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34:1309-13.

Graido-Gonzales E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E₂ levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* 1998; 92:2551-5.

Granger DN, Senchenkova E. *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. capítulo 7.

Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007; 191:48-53.

Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 28:5-13.

Haymann JP, Stankovic K, Levy P, Avellino V, Tharaux PL, Letavernier E, et al. Glomerular hyperfiltration in adult sickle cell anemia: a frequent hemolysis associated feature. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5:756-61.

Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 2004; 11:129-51.

Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 1989; 73:1081-104.

Higgs DR, Wood WG. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proc Natl acad Sci USA* 2008; 105:1195-96.

Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet* 2012; 379:373-83.

Hill AVC, Wainscoat JS. The evolution of the α and β -globin gene cluster in human populations. *Hum Genet* 1986; 74:16-23.

Hillman RS, Finch CA. *Red cell manual*. 6^a edition, USA: Ed. F.A. Davis Company, 1992, p.1-147.

Hughes HY, Kutlar F, Clair B, Elam D, McKie KM, Kutlar A. Haptoglobin genotypes among pediatric and adult sickle cell patients: an emerging genetic modifier? In: 47th ASH Annual Meeting; 2005, *Blood Suppl*; v. 106, Abstract 3805.

Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica* 2008; 93:481-5.

Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are

associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* 2005; 130:943-53.

Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA. Sickle Red Cell-Endothelium Interactions. *Microcirculation* 2009; 16:97-111.

Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, Kimura H. The haptoglobin-gene deletion responsible for anhapoglobinemia. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:245-52.

Koda y, Soejima M, Yamagishi S, Amano S, Okamoto T, Inagaki Y, et al. Haptoglobin genotype and diabetic microangiopathies in Japanese diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45:1039-40.

Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood* 1989; 74:1403-8.

Krishnan S, Siegel J, Pullen G, Hevelow M, Dampier C, Stuart M. Increased von Willebrand factor antigen and high molecular weight multimers in sickle cell disease associated with nocturnal hypoxemia. *Thromb Res* 2008; 122:455-8.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409:198-201.

Kurowska-Stolarska M, Alivernini S, Ballantine LE, Asquith DL, Millar NL, Gilchrist DS, et al. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108:11193-8.

Kutlar A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single-gene disorder. *Med Princ Pract* 2005; 14:15-9.

Labie D, Elion J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. *Pathol Biol* 1999; 47:7-12.

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 2009; 85:235-42.

Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42:1589-600.

Langlois MR, Delanghe JR, De Buyzere ML, Bernard DR, Ouyang J. Effect of haptoglobin on the metabolism of vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:606-10.

Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MAC, Araújo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the *BCL11A*, *HBSIL-MYB*, and *β-globin* loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:11869-74.

Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130:461-70.

Levy AP, Roguin A, Hochberg I, Herer P, Marsh S, Nakhoul FM, et al. Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. *N Engl J Med* 2000; 343:969-70.

Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick H, Lee ET, Best L, et al. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The strong heart study. *JACC* 2002; 40:1984-90.

Levy AP. Genetic of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. *Acta Diabetol* 2003; 40:330-3.

Levy AP, Asleh R, Blum S, Levy NS, Miller-Lotan R, Kalet-Litman S, et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12:293-304.

Lim YC, Snapp K, Kansas GS, Camphausen R, Ding H, Luscinskas FW. Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human

monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF-alpha-activated endothelium under flow in vitro. *J Immunol* 1998; 161:2501-08.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.

Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:1237-43.

Makis AC, Hatzimichael EC, Stebbing J, Bourantas KL. C-Reactive Protein and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 as Markers of Severity in Sickle Cell Disease. *Arch Intern Med* 2006; 166:367.

McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leucocyte-endothelial interactions. *Curr Opin Hematol* 2003; 10:150-8.

Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM, et al. Structure-function analysis of antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001; 98: 3693-8.

Menzel S, Jiang J, Silver N, Gallagher J, Cunningham J, Surdulescu G, et al. The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood* 2007; 110:3624-6.

Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *American Journal of Hematology* 2010; 85:831-3.

Minniti CP, Taylor VI JG, Hildesheim M, O'Neal P, Wilson J, Castro O, et al. Laboratory and Echocardiography Markers in Sickle Cell Patients with Leg Ulcers. *Am J Hematol* 2011; 86:705-8

miRBase: the microRNA database. Web site (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>) 2012.

Monchanin G, Serpero LD, Connes P, Tripette J, Wouassi D, Francina A, et al. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without alpha-thalassemia during endurance exercise and recovery. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008; 40:89-97.

Nagel RL, Labie D. DNA haplotypes and the β^S globin gene. *Prog Clin Biol Res* 1989; 316B:371-93.

Nakhoul FM, Marsh S, Hochberg I, Leibur R, Miller BP, Levy AP. Haptoglobin genotypes as a risk factor for diabetic retinopathy. *JAMA* 2000; 284:1244-5.

Nakhoul FM, Zoabi R, Kanter Y, Zoabi M, Skorecki K, Hochberg I, et al. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001; 44:602-4.

Nakhoul FM, Miller-Lotan R, Awaad H, Asleh R, Levy AP. Hypothesis α -haptoglobin genotype and diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007; 3:339-44.

Nath KA, Katusic ZS, Gladwin MT. The perfusion paradox and vascular instability in sickle cell disease. *Microcirculation* 2004; 11:179-93.

Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol* 2006; 133:570-8.

O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:1604-9.

Orkin SH, Higgs DR. Sickle cell disease at 100 years. *Science* 2010; 329:291-2.

Ostrowski SR, Travis JC, Talley ES. The association of Hp1 and sickle cell disease. *Hum Hered* 1987; 37:193-5.

Ostrowski SR, Travis JC, Talley ES. The association of hemoglobin SC disease and haptoglobin phenotypes. 1988; 12:387-90.

Pace BS, Ofori-Acquah SF, Peterson KR. Sickle cell disease: genetics, cellular and molecular mechanisms, and therapies. *Anemia* 2012; 2012:143594.

Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine Profile of Sickle Cell Disease in Oman. *Am J Hematol* 2004; 77:323-8.

Peral MC, Rachid MM, Gobbato NM, Huaman Martinez MA, Valdez JC. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:281-6.

Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of hemoglobin. *Nature* 1960; 185:416-22.

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

Pukstad BS, Ryan L, Flo TH, Stenvik J, Moseley R, Harding K, et al. Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers. *J Dermatol Sci* 2010; 59:115-22.

Quaye IK. Haptoglobin, inflammation and disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102:735-42.

Raman K, Chong M, Akhtar-Danesh GG, D'Mello M, Hasso R, Ross S, et al. Genetic Markers of Inflammation and Their Role in Cardiovascular Disease. *Can J Cardiol*. 2012; S0828-282X:00335-2.

Ramamoorthy RD, Nallasamy V, Reddy R, Esther N, Maruthappan Y. A review of C-reactive protein: A diagnostic indicator in periodontal medicine. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012; 4(Suppl 2):S422-6.

Reiter CD, Gladwin MT. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Curr Opin Hematol* 2003; 10:99-107.

Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am j Clin Pathol* 2004; 121:97-104.

Safaya S, Steinberg MH, Klings ES. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF- κ B signaling pathway. *Mol Immunol* 2012; 50:117-23

Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 2010; 116:4338-48.

Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 2008; 322:1839-42.

Sankaran VG, Xu J, Ragoczy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, et al. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature* 2009; 460:1093-7.

Santos MN, Bezerra MA, Domingues BL, Zaccariotto TR, Oliveira DM, Costa FF, et al. Haptoglobin genotypes in sickle-cell disease. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15:709-13.

Santos MNN, Ferreira R, Albuquerque DM, Oliveira RTD, Bezerra MAC, Lanaro C. An association between microRNA-155 and the Hp genotype in patients with sickle cell anemia. *The American Society For Cell Biology (ASCB) Annual Meeting* 2012; 727–B1146.

Satta S, Perseu L, Moi P, Asunis I, Cabriolu A, Maccioni L, et al. Compound heterozygosity for KLF1 mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica* 2011; 96:767-70.

Savitt TL, Goldberg MF. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia the rest of the story . *JAMA* 1989; 261:266-71.

Schnog JB, Mac Gillavry MR, van Zanten AP, Meijers JC, Rojer RA, Duits AJ, et al. Protein C and S and inflammation in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2004; 76:26-32.

Serjeant GR. Leg ulceration in sickle cell anemia. *Arch Intern Med* 1974; 133:690-4.

Serjeant GR. Sickle-cell disease. *The Lancet* 1997; 350:725-30.

Setty BN, Stuart MJ. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood* 1996; 88:2311-20.

Setty BNY, Rao AK, Stuart MJ. Thrombophilia in sickle cell disease. The red cell connection. *Blood* 2001; 98:3228-33.

Setty BNY, Betal SG. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood* 2008; 111:905-14

Smith II CM, Kuettner JF, Turey DP, Burris SM, White JG. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. *Blood* 1981; 58:71-7.

Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337:1584-90.

Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: the hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr* 2008; 84:40-51.

Souza AW, Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Cruvinel WM, Andrade LE, et al. Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 665-79.

Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27:204-10.

Steinberg MH, Adewoye AH. Modifier genes and sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol* 2006; 13:131-6.

Steinberg MH. Sick cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal* 2008; 8:1295-324.

Strijbos MH, Landburg PP, Nur E, Teerlink T, Leebeek FW, Rijneveld AW, et al. Circulating endothelial cells: a potential parameter of organ damage in sickle cell anemia? *Blood Cells Mol Dis* 2009; 43:63-7.

Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell disease. *Lancet* 2004; 364:1343-60.

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:12481-6.

Telen MJ. Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 84-90.

Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137:398-407.

Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:3047-51.

van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009; 94:1513-9.

Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta*, 2004; 345:35-42.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3:1-12.

Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JAB. Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 321-5.

Wesson DE. The initiation and progression of sickle cell nephropathy. *Kidney International* 2002; 61:2277-86.

Wigfall DR, Ware RE, Burchinal MR, Kinney TR, Foreman JW. Prevalence and clinical correlates of glomerulopathy in children with sickle cell disease. *J Pediatr* 2000; 136:749-53.

Wobeto VPA, Rosim ET, Melo MB, Calliari LEP, Sonati MF. Haptoglobin polymorphism and diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77:385-8.

Wobeto VPA, Zaccariotto TR, Sonati MF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genet Mol Biol* 2008; 31:602-20.

Wood K, Russell J, Hebbel RP, Grange DN. Differential expression of E- and P-selectin in the microvasculature of sickle cell transgenic mice. *Microcirculation* 2004; 11, 377-85.

Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:1506-28.

Yano A, Yamamoto Y, Miyaishi S, Ishizu H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med Okayama* 1998; 52:173-81.

Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood* 2003; 102:365-70.

Zago MA, Pinto ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29:207-14.

Zennadi R, Chien A, Xu K, Batchvarova M, Telen MJ. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. *Blood* 2008; 112:3474-83.


Zhao B, Stavchansky SA, Bowden RA, Bowman PD. Effect of interleukin- 1beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2003; 284:1577-83.

Zhou Z, Han H, Cruz M, López, J, Dong JF, Guchhait P. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: A mechanism associated with sickle cell disease. *Thromb Haemost* 2009; 101:1070-7.

Zhou Z, Yee DL, Guchhait P. Molecular Link between Intravascular Hemolysis and Vascular Occlusion in Sickle Cell Disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10:756-61.

8. ANEXOS

Anexo 1:

	<p style="text-align: center;">Comitê de Ética em Pesquisa</p> <p style="text-align: center;">Av. Joaquim Nabuco, 171 Graças Recife-PE CEP: 52011-000- Tel.: (81) 3182-4771 C-eletrônico: cep_hemope@gmail.com</p>	
-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

1 – DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL Nº. 001/2009

Título do Projeto: Aspectos inflamatórios *versus* genótipos da haptoglobina e presença do polimorfismo CCR5delta32 na anemia falciforme.

Instituição Solicitante: Universidade Estadual de Campinas- Departamento de Patologia Clínica –FCM.

Pesquisador: Magnum Nueldo Nunes dos Santos

Endereço: Avenida do Ipê Amarelo- 885- Casa 65- Condomínio Cerejeiras- Villa Flora- Sumaré –São Paulo- CEP: 13175-667 - **Telefone:** 19-3521-8960 **Identidade:** 5690648 **CPF:** 008.005.994-54

Finalidade: Projeto de Doutorado

Orientadoras: Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati e Profa. Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Co-orientador: Prof. Dr. Aderson da Silva Araújo

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação HEMOPE- Hospital de Hematologia.

2 – COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Objetivo Geral: Determinar se os genótipos da haptoglobina e a presença do alelo CCR5delta32 se correlacionam com as taxas de expressão gênica e com os níveis plasmáticos das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10, dos mediadores inflamatórios (IFN- γ e TNF- α) e das moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) produzidos em pacientes adultos com anemia falciforme (HbSS), acompanhados no Hemocentro de Pernambuco- HEMOPE.

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. 001/09**, 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.z), 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 22/7/2009


Ana Lucia Sena
Coordenadora -CEP-HEMOPE

Anexo 2:

ROTEIRO PARA ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

IDENTIFICAÇÃO

Nome do Paciente: _____ Sexo: _____

Registro HEMOPE: _____ Data de nascimento/Idade: _____

Etnia: _____ Data diagnóstico de AF: _____

Tipagem sanguínea: _____ Imunofenotip. eritrocitária: _____

DADOS LABORATORIAIS

Hb Fetal: _____% Hb S: _____% HbA2: _____%

Data última transfusão sanguínea: Observar se houve no período: Set/09-fev/10

HEMOGRAMA – Último hemograma (sem transfusão / fora de crise)

Hb: _____ Ht: _____ VCM: _____ HCM: _____ CHCM: _____

Reticulócitos: _____

Leucócitos: _____ (Número Absoluto)

Linf.: _____ Mon.: _____ Neut: _____ Eosin: _____

Contagem de plaquetas: _____

COAGULOGRAMA

TP: _____ TTPA: _____ RNI: _____ R: _____

BIOQUÍMICA

LDH: _____ Creatinina sérica: _____ PCR: _____

Bilirrubina Total: _____ B. Direta: _____ B. Indireta: _____

Ferro Sérico: _____ Ferritina: _____ VB12: _____

AST: _____ ALT: _____ Gama GT: _____ Fosfatase Alcalina: _____

Cálcio Sérico:_____ Uréia: _____ Sódio:_____ Potássio: _____

Creatinina:_____ Clearance de Creatinina: _____

Microalbuminúria:_____ Relação MALB/CREA: _____

DADOS CLÍNICOS

Comorbidades ? Diabetes, Hipertensão, Obesidade ?

Número de crises álgicas/ano – anotar ano.

Acidente Vascular Encefálico – anotar ano.

Número de Transfusões/ano – anotar ano.

Número de Infecções/ano – anotar ano e caracterizá-la – Urina, pele...

Síndrome torácica – anotar ano e evolução.

Hepatoesplenomegalia – anotar outros achados

Colelitíase

Cardiomiopatia

Necroses ósseas (NACF)

Osteoporose

Priapismo – Anotar crises/ano

Úlceras de pele – Anotar evolução se possível

Outras doenças da pele

Achados interessantes no exame físico – último ano

Anotar qualquer intercorrência que leve o paciente ao médico. Se houver exames laboratoriais anotar. Exemplo: Paciente procura o serviço devido a febre e tosse. Diagnosticada pneumonia: se houver hemograma, atentar para as características laboratoriais.

Uso de Hydrea: () sim () Não

Tempo:

Outro medicamento: () Sim Qual(is):

Tempo: