



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



**Polimorfismos Gênicos da Haptoglobina na
Anemia Falciforme: Possíveis Implicações nos
Fenômenos Vaso-oclusivos e Resposta Imunológica**

Cristiane Ferraz de Oliveira Santos

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marilda de Souza Gonçalves

SALVADOR-BAHIA-BRASIL

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



CRISTIANE FERRAZ DE OLIVEIRA SANTOS

**Polimorfismos Gênicos da Haptoglobina na
Anemia Falciforme: Possíveis Implicações nos
Fenômenos Vaso-oclusivos e Resposta Imunológica**

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilda de Souza
Gonçalves

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-Graduação em Imunologia
como parte do requisito para obtenção do
grau de Mestre em Imunologia.

Salvador - Bahia - Brasil
2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

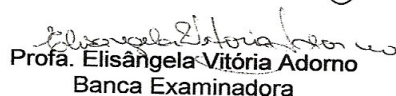


ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA PÓS-GRADUANDA CRISTIANE FERRAZ DE OLIVEIRA SANTOS.

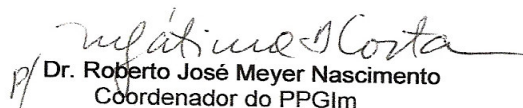
Aos 26 dias do mês de dezembro do ano de dois mil e sete, às 09h00, no auditório III no segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelas Professoras: Dra. Marilda de Souza Gonçalves, orientadora, Dra. Maria Bethânia Pereira Toralles e Dra. Elisângela Vitória Adorno com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação de Mestrado intitulado: **"Polimorfismos Gênicos da Haptoglobina na Anemia Falciforme: Possíveis Implicações nos Fenômenos Vaso-oclusivos e Resposta Imunológica"** da pós-graduanda **CRISTIANE FERRAZ DE OLIVEIRA SANTOS**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelas examinadoras. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação de Mestrado APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 26 de dezembro de 2007.


Prof. Marilda de Souza Gonçalves
Orientadora


Prof. Maria Betânia Pereira Toralles
Banca Examinadora


Prof. Elisângela Vitória Adorno
Banca Examinadora


Cristiane Ferraz de Oliveira Santos
Mestranda


Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Coordenador do PPGIm

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Santos, Cristiane Ferraz de Oliveira
S237a Polimorfismos gênicos da haptoglobina na anemia falciforme:
possíveis implicações nos fenômenos vaso-oclusivos e resposta
imunológica [manuscrito] / Cristiane Ferraz de Oliveira Santos. - 2008.
112 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de
Ciências da Saúde, 2008.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilda de Souza Gonçalves. Laboratório de
Patologia e Biologia Molecular.

1. Anemia falciforme. 2. Haptoglobina. 3. Polimorfismo. 4. IL-6. I.Título.

CDU 616.155.194

FONTES DE FINANCIAMENTO

- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- FAPESB – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia. Processo n° 0012/2007
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me ajudado em todos os momentos da minha vida e em especial nesse momento.

À Prof^a. Dr^a. Marilda de Souza Gonçalves que é professora dedicada e pesquisadora exemplar, agradeço a oportunidade de ter a sua orientação neste trabalho, e pelo aprendizado que eu posso obter estando ao seu lado, não só nas questões acadêmicas, mas, sobretudo no dia a dia da nossa convivência.

Ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UFBA, pelo apoio necessário para conclusão deste trabalho, e aos professores do PPGIm pela atenção ao longo do curso.

À secretaria do PPGIM, em especial a Dilcéia, pela sua atenção e disponibilidade em todos os momentos.

Ao Dr. Mittermayer Galvão dos Reis, chefe do LPBM/CPqGM/FIOCRUZ, por permitir a utilização das instalações do laboratório e pelo acompanhamento do trabalho.

À coordenação do Hospital da Criança das Obras Sociais Irmã Dulce que proporcionou os meios para que o trabalho fosse realizado naquela unidade, especialmente a Dra Célia Silvany, e a Dra. Izadora Siqueira pela disponibilidade, dedicação e atenção em todo o desenvolvimento do trabalho.

À equipe do laboratório de análise clínicas das Obras Sociais Irmã Dulce, especialmente a Vanleide e Rosangela que realizaram as coletas de sangue.

À HEMOBA por permitir a realização do projeto, especialmente às médicas Ângela Zanette e Iza Lyra; e a toda equipe de enfermagem, auxiliares e técnicos.

A Dra Carmem Teixeira e Dr. Maurício Barreto pela concessão das amostras do Projeto Bahia Azul, que constituíram o grupo de referência utilizado neste trabalho.

À Dr.Prof. Ajax Atta e a bioquímica Isabela do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia de da UFBA.

À equipe do LPBM, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas de equipe especialmente a Bruno, Cynara, Cyntia, Daniele, Elder, Elisângela, Fabrício, Joelma, José, Luciano, Magda, Mário, Nadja, Renato, Wendell, pela amizade e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Josilene, Cristiane, Aline, Cinthia, Kátia, Pedro, Dr. Ricardo Couto, Ana Fabrícia, Felipe, Lis e Antônio que estiveram ao meu lado sejam no início, meio ou fim desta trajetória.

Aos pacientes e aos pais dos menores que concordaram com a participação das crianças neste estudo, submetendo-se aos procedimentos pertinentes, pela disponibilidade e credibilidade.

À minha família, especialmente minha mãe Anelite, que sempre representou para mim um exemplo de pessoa que coloca a família à frente de tudo; ao meu pai Eurico, em memória; aos meus irmãos Leandro, tão presente na minha vida, e a Vinicius.

A todos aqueles que mesmo não sendo citados nominalmente, colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

POLIMORFISMOS GÊNICOS DA HAPTOGLOBINA NA ANEMIA FALCIFORME: POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES NOS FENÔMENOS VASO-OCCLUSIVOS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA. **CRISTIANE FERRAZ DE OLIVEIRA SANTOS.**

A anemia falciforme é uma doença que é caracterizada pela presença da hemoglobina S (HbS). A doença apresenta quadro clínico heterogêneo, caracterizado por vaso-oclusão e eventos infecciosos, o que leva há um estado pró-inflamatório crônico. A Bahia é o estado que possui a frequência mais elevada de HbS e maior prevalência da anemia falciforme. Desta forma vários estudos vêm sendo realizados visando a identificação de fatores que possam influenciar no prognóstico clínico da doença. A haptoglobina (Hp) é uma proteína de fase aguda que se liga ao heme, e possui função antioxidante. O objetivo desse trabalho foi investigar uma provável influência de polimorfismos gênicos na Hp nos aspectos fenotípicos e imunológicos de portadores de anemia falciforme de Salvador-Bahia. Foi realizado um estudo ambispectivo em 141 pacientes, 118 em estado estável (PE) e 23 hospitalizados por vaso-oclusão (PC). Também foi incluído no estudo um grupo de referência composto por 171 indivíduos controles normais provenientes da cidade do Salvador. A talassemia $\alpha 2^{3.7Kb}$, os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e os polimorfismos da Hp foram investigados por PCR e PCR-RFLP; os níveis séricos do TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram detectados por ELISA e a história clínica dos pacientes foi obtida dos prontuários médicos. Os valores médios de volume corpuscular médio apresentaram-se mais elevados entre os pacientes portadores do haplótipo Ben/Ben no grupo PE ($p < 0,05$). Pacientes do grupo PE portadores do haplótipo CAR/Ben apresentaram frequência elevadas de eventos vaso-oclusivos (37,8%) em comparação aos demais haplótipos ($p < 0,05$). A frequência de infecções por broncopneumonia e pneumonia no grupo PC foi mais elevada nos portadores do haplótipo CAR/Ben em comparação ao CAR/CAR. Os pacientes do grupo PC portadores de talassemia $\alpha 2^{3.7 Kb}$ em homozigose do grupo apresentaram os níveis médios de hematócrito mais elevados ($p < 0,05$). O grupo PE apresentou frequências mais elevadas dos alelos *HP1S* e *HP1F* ($p = 0,0041$, $OR = 2,27$, $IC95\% = 1,27-4,08$); $p < 0,000$, $RP = 2,99$, $IC = 1,65-5,41$) e menores do alelo *HP2* ($p < 0,0000$, $OR = 0,31$, $IC95\% : 0,17-0,59$) quando comparados ao grupo controle. O grupo PC apresentou frequência maior do alelo *HP1F* ($p = 0,0050$, $OR = 3,83$, $IC95\% : 1,4-10,3$) e menor do alelo *HP2* ($p = 0,0427$, $OR = 0,34$, $IC95\% : 0,34-0,97$) quando comparado ao grupo controle. Os indivíduos do grupo PC portadores do genótipo Hp1S-1S e do grupo PE portadores do genótipo Hp2-1S apresentaram níveis mais elevados de IL-6 que os demais genótipos da Hp ($p < 0,05$). Estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel dos níveis de IL - 6, bem como a influência dos genótipos da haptoglobina sobre o quadro clínico de pacientes com anemia falciforme, uma vez que estes podem se constituir em marcadores de prognóstico que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento clínico destes indivíduos.

Palavras chave: Anemia falciforme, haptoglobina, vaso-oclusão, IL-6.

ABSTRACT**GENETICS POLYMORPHISM OF HAPTOGLOBIN IN SICKLE CELL ANEMIA: POSSIBLE IMPLICATIONS IN VASO-OCCLUSION AND IMMUNE RESPONSE. CRISTIANE FERRAZ DE OLIVEIRA SANTOS.**

The sickle cell anemia is a disease that is characterized by the presence of S hemoglobin (HbS). The disease has a heterogeneous clinical outcome, characterized by vaso-occlusive and infection events, contributing to a chronic pro-inflammatory condition. The Bahia is the state that has the highest frequency of HbS and greater prevalence of sickle cell anemia. So many studies have been conducted aimed at identifying factors that may influence the clinical prognosis of the disease. The haptoglobin (Hp) is a protein of the acute phase that binds to heme, and has antioxidant function. The aim of this work was to investigate a probable influence of haptoglobin gene polymorphism in the phenotypic and immunological aspects of bearers with sickle cell anemia, Salvador-Bahia. A study was performed ambispectivo in 141 patients, 118 in steady state (PE) and 23 hospitalized by vaso-occlusion (PC). Also included in the study was a reference group composed of 171 individuals from normal controls of the city of Salvador. The $\alpha 2^{3.7Kb}$ - thalassemia, the β^S -globin gene haplotypes, the haptoglobin gene polymorphism were investigated by PCR and PCR-RFLP; the TNF- α , IL-1 β e IL-6 serum levels were measured by ELISA and clinical histories were search from clinical records. The mean volume corpuscular average had been higher among patients carrying the haplótipo Ben / Ben in the PE group ($p < 0.05$). Patients in the group PE carrying the haplótipo CAR / Ben had high frequency of events vaso-occlusive (37.8%) compared to the other haplotypes ($p < 0.05$). The frequency of infection and pneumonia bronchopneumonia in the PC group was higher in the carriers of haplótipo CAR / Ben compared to the CAR / CAR. Patients from PC group and homozygous for $\alpha 2^{3.7Kb}$ - thalassemia showed a higher hematocrit concentration ($p < 0.05$). The PE group presented high frequencies of HP1S and HP1F alleles ($p = 0.0041$, OR=2.27, CI95%= 1.27-4.08; $p < 0.000$, OR=2.99, CI= 1.65-5.41) and lesser of HP2 allele ($p < 0.0000$, OR=0.31, CI:0.17-0.59) when compared with the control group. The PC group had a high frequency of HPIF allele ($p = 0.0050$, OR=3.83, IC95%: 1.4-10.3) and lesser of HP2 allele ($p = 0.0427$, OR=0.34, CI95%:0.12-0.97) alleles when compared to control group. Those in the PC group bearers of the genotype Hp1S-1S and group PE carry the genotype Hp2-1S showed higher levels of IL-6 than the others Hp genotypes ($p < 0.05$). Additional studies are important to establish the role of the IL-6 levels, and the influence of haptoglobin genotypes on the clinical picture of sickle cell anemia, since these can be used as a prognosis markers in the future clinical monitoring of these individuals.

Keywords: Sickle cell anemia, haptoglobin, vaso-occlusion, IL-6.

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - A Distribuição geográfica dos haplótipos ligados ao grupo de gene da globina β^S na África e regiões do Oriente Médio. B - Seqüência de polimorfismos gênicos localizados no cromossomo 11, demonstrando o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de STUART & NAGEL, 2004	25
Figura 2 - Mapa esquemático das diferentes estruturas da molécula da haptoglobina. A Hp1-1 se apresenta na forma de dímeros, a Hp2-1 na forma linear, a Hp2-2 na forma cíclica. Adaptado de VAN VLIERBERGHE, 2004	29
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos genes da haptoglobina. Os boxes indicam os éxons. Adaptado de YANO et al., 1998	33
Figura 4 - Representação esquemática do delineamento do estudo	45
Figura 5 - Análise de regressão linear entre os níveis de IL-1 β e a ocorrência de crises vaso-oclusivos no grupo de pacientes estáveis.....	64
Figura 6 - Análise de regressão linear entre os níveis de IL-1 β e a ocorrência de crises esplenomegalia no grupo de pacientes estáveis.	64
Figura 7 - A e B. Eletroforese em gel de agarose a 1%, demonstrando os padrões de bandas apresentadas nos diferentes genótipos da haptoglobina (Hp) (YANO et al., 1998).	65-66

LISTAS DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos inicializadores (primers) utilizados nas reações de PCR, localização, tamanho dos fragmentos gerados e enzimas de restrição utilizadas nas reações de PCR e RFLP para a pesquisa dos polimorfismos em genes dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e talassemia $\alpha_2^{3.7Kb}$	47-48
Tabela 2 - Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos inicializadores (primers) utilizados nas reações de PCR para identificação do genótipo da haptoglobina.	50
Tabela 3 - Reação entre os diferentes pares de primers, contundo a identificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na reação de PCR para identificação dos genes da haptoglobina.	50
Tabela 4 - Distribuição dos dados hematológicos de portadores de anemia falciforme em estado estável da doença e internados.	56
Tabela 5 - Distribuição dos dados hematológicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme em estado estável e internados	57
Tabela 6 - Distribuição dos genótipos dos haplótipos ligados aos grupos dos genes da globina beta S em portadores de anemia falciforme em estado estável e internado por crise.	57
Tabela 7 - Distribuição dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S e dados hematológicos em portadores de anemia falciforme em estado estável.	58

Tabela 8 - Distribuição dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S e dados hematológicos em portadores de anemia falciforme internados	59
Tabela 9 - Distribuição dos genótipos da globina beta S e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme em estado estável da doença.	60
Tabela 10 - Distribuição dos genótipos da globina beta S e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme internados em crise.	61
Tabela 11 - Distribuição da talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ e sua associação com aspectos hematológicos e fenotípicos apresentados por pacientes com anemia falciforme em estado estável.....	62
Tabela 12 - Distribuição da talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ e sua associação com aspectos hematológicos e fenotípicos em pacientes com anemia falciforme internados por crise.	63
Tabela 13 - Frequências dos alelos e genótipos da haptoglobina dos pacientes estáveis e internados em crise, portadores de anemia falciforme, em relação ao grupo referência.	67
Tabela 14 - Frequências dos genótipos agrupados de acordo os alelos da haptoglobina dos pacientes estáveis e internados em crise em relação ao grupo referência	68
Tabela 15 - Distribuição das frequências alélicas e genóticas da haptoglobina nos grupos de pacientes com anemia falciforme em estado estável e internados e no grupo referência.	68-69

Tabela 16 - Distribuição dos genótipos da Hp e dados hematológicos entre portadores de anemia falciforme em estado estável.	70
Tabela 17 - Distribuição dos genótipos da Hp e dados hematológicos entre portadores de anemia falciforme em crise.	71
Tabela 18 - Distribuição do genótipo da Hp e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme em estado estável. ...	72
Tabela 19 - Distribuição do genótipo da Hp e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme internados.	73
Tabela 20 - Genótipo da Hp e história clínica das infecções apresentadas pelos portadores de anemia falciforme em estado estável e internados em crise.	74
Tabela 21 - Distribuição dos genótipos da Hp e sua associação com da talassemia $\alpha 2^{3.7\text{Kb}}$ em pacientes estáveis e internados.	74
Tabela 22 - Associação entre os genótipos da Hp e os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em pacientes estáveis e crise.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

A1	Hemoglobina 1 do Adulto
A2	Hemoglobina 2 do Adulto
AC	Heterozigoto para hemoglobina C
APAE	Associação de pais e amigos dos excepcionais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	Heterozigoto para hemoglobina S
Atp	Haplótipo Atípico
Bcp	Broncopneumonia
AVC	Acidente vascular cerebral
Ben	Haplótipo Benin
Cam	Haplótipo Camarões
CAR	Haplótipo Bantu (República Central Africana)
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio Imuno Enzimático ligado a Enzima (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hm	Hemácias
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida

Hp	Haptoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (<i>High performance liquid chromatograph</i>)
HRP	Peroxidase horseradish
Ht	Hematócrito
IC	Intervalo de confiança
k ⁺	Íon potássio
Kb	Kilobases
KD	Kilodáltons
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
ITR	Infecção do trato respiratório
ITU	Infecção do trato urinário
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Superóxido
-OH	Radical hidroxila
OR	Razão de probabilidade (<i>Odds ratio</i>)
PA	Paciente internado em alta hospitalar
pb	Pares de base
PC	Paciente internado em crise vaso-oclusiva
PCR	Reação da polimerase em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Paciente em estado estável
PHHF	Persistência hereditária de hemoglobina fetal

RL	Radicais livres
RPFL	Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição <i>(Restriction fragment length polymorphism)</i>
SC	Heterozigoto duplo para as hemoglobinas S e C
Sen	Haplótipo Senegal
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo simples <i>(Single nucleotide polymorphism)</i>
SS	Homozigoto para hemoglobina S ou portador de anemia falciforme
VCAM	Molécula de adesão à célula vascular
VCM	Volume corpuscular médio
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	08
<i>ABSTRACT</i>	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 HEMOGLOBINA	18
1.1.1 A HEMOGLOBINA S E SUA EPIDEMIOLOGIA	19
1.2 ANEMIA FALCIFORME	21
1.2.1 DEFINIÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	21
1.2.2 HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β^S	23
1.2.3 MODULAÇÃO CLÍNICA NA ANEMIA FALCIFORME	24
1.3 HAPTOGLOBINA	26
1.3.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES DA HAPTOGLOBINA	26
1.3.2 POLIMORFISMOS GÊNICOS DA HAPTOGLOBINA	30
1.3.3 POLIMORFISMOS DA HAPTOGLOBINA EM ALGUMAS PATOLOGIAS	32
1.4 CITOCINAS	34
1.4.1 A ANEMIA FALCIFORME E O TNF- α , IL-1 β E IL-6	35
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVO GERAL	39
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41

5.1 CASUÍSTICA	42
5.2 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	44
5.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E HEMOGLOBINAS	45
5.4 ANÁLISE MOLECULAR	45
5.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	45
5.4.2 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β^S	45
5.4.3 DETERMINAÇÃO DA TALASSEMIA $\alpha 2^{3.7\text{KB}}$	47
5.4.4 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO NOS GENE DA HAPTOGLO- BINA	48
5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	49
5.5.1 NÍVEIS DE IL-1 β	49
5.5.2 NÍVEIS DE IL-6	51
5.5.3 NÍVEIS DE TNF- α	52
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
6 RESULTADOS	54
6.1 HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β^S , TALASSEMIA α , CITOCINAS E FENÓTIPO	56
6.2 POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA	64
7 DISCUSSÃO	75
8 CONCLUSÕES	86
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
10 ANEXOS	106

INTRODUÇÃO

1.1 HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente nos eritrócitos, com função de absorção, transporte e liberação de oxigênio aos tecidos, bem como transporte de parte do dióxido de carbono. A Hb é formada por quatro subunidades protéicas denominadas globinas, iguais duas a duas e caracterizadas como sendo do tipo alfa (alfa- α e zeta- ξ) e não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ e épsilon- ϵ). Essas cadeias são produtos da expressão de genes localizados no braço curto dos cromossomos 16(genes α) e 11(genes não- α), e recebem denominações semelhantes às das cadeias polipeptídicas que dão origem. As cadeias de globina estão ligadas ao grupo prostético, a protoporfirina IX, que quando ligado ao ferro, é denominado de grupo heme (FAIRBANKS *et al.* 1987).

As cadeias polipeptídicas da globina são compostas por números diferentes de aminoácidos, sendo que as cadeias α possuem 141 aminoácidos e as cadeias não- α 146. As combinações entre os diferentes tipos de cadeias formam diversos tipos de Hb que são encontradas em períodos diferentes do desenvolvimento ontogênico, com descrição da Hb Gower 1 ($\xi_2 \epsilon_2$), Hb Portland ($\xi_2 \gamma_2$) e Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) no período embrionário, a hemoglobina fetal(HbF) ($\alpha_2 \gamma_2$) no período fetal e as hemoglobinas A₁ ($\alpha_2 \beta_2$), A₂ ($\alpha_2 \delta_2$) e F na vida adulta. A hemoglobina que possui as maiores concentrações na vida adulta é HbA₁, com 95 a 98%; a HbA₂ com 1,5 a 3,5% e a HbF com até 2%. No final da gestação, a HbF representa 70-80% do total das hemoglobinas, sendo que aos seis meses após o nascimento, já apresenta as concentrações relativas a vida adulta (BUNN *et al.*, 1986).

A molécula de Hb pode apresentar alterações hereditárias, denominadas hemoglobinopatias, que são classificadas em dois tipos: (1) mutações em genes da globina que resultam em alterações estruturais nas cadeias polipeptídicas, sendo as mais frequentes as hemoglobinas S, C e E; (2) mutações em genes da globina que levam a

diminuição ou ausência de produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas, denominadas talassemias. Nesse segundo grupo estão incluídos os indivíduos com persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF) (LEE *et al.*, 1992; BUNN, 1994; BUNN, 1997; WEATHERALL & PROVAN, 2000).

A talassemia α é caracterizada pela diminuição ou ausência de cadeia globina α , em decorrência de deleções ou mutações pontuais em um ou mais genes α (FOGLIETTA *et al.*, 1996). A talassemia α_2 decorrente da deleção de 3,7 kibases de DNA (3.4Kb) é o tipo mundialmente mais freqüente, sendo que o estudo realizado no Brasil em indivíduos afro-descendentes do sudeste do país, descreveu freqüências de 20 a 25% para este tipo de talassemia (SONATI *et al.*, 1991). Em um estudo realizado na Bahia, foi descrito a freqüência de 23% para talassemia $\alpha_2^{3.7 \text{ Kb}}$ entre gestantes com o perfil de hemoglobina AC e AA (COUTO *et al.*, 2003).

1.1.1 A HEMOGLOBINA S E SUA EPIDEMIOLOGIA

A HbS resulta de uma mutação pontual no sexto códon do gene da globina beta (GAG→GTG), levando a substituição da adenina por timina e conseqüentemente do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica beta. Existem indivíduos que são portadores da cadeia β^S e da cadeia β normal, sendo denominado de HbAS (heterozigoto). A HbS em condições de hipóxia forma polímeros que se depositam nas hemácias modificando sua forma, tornando-as alongadas (falciforme). A falcização das hemácias é um fenômeno reversível, sendo que a hemácia volta à forma original após oxigenação. Contudo, após repetidos episódios de falcização, a hemácia torna-se irreversivelmente falcizada (BUNN *et al.*, 1986).

A hemoglobina S possui freqüência mundial elevada, predominando na África tropical, e em freqüência menor na bacia mediterrânea, Arábia Saudita, e regiões da

Índia. Em alguns países da África, até 45% da população apresenta heterozigose para a HbS. Nos Estados Unidos, América Latina e Caribe, a incidência do portador é de 1 em 625 indivíduos (WINTROBE, 1998).

Estudos da ANVISA (2002) descreveram que a região sudeste do Brasil apresenta frequência de 2% para os heterozigotos (HbAS) na população geral e de 6 a 10% em indivíduos da população negra. A frequência de 6,6% foi descrita para indivíduos heterozigotos afro-descendentes do Estado de São Paulo, com prevalência de 0,1% para os homozigotos (Hb SS) (RAMALHO 1986). O estudo realizado em 281.884 recém-nascidos do programa de triagem neonatal de Campinas descreveu a prevalência de 0,02% para a doença falciforme (SS e SC) (BRANDELISE *et al.*, 2004).

A Bahia possui uma população que apresenta grande mistura racial (índios, negros e caucasóides de origem européia), gerando características genótípicas únicas. No Brasil, a Bahia possui a maior frequência de indivíduos AS, com descrição de frequências entre 4,7% a 15,7% (AZEVEDO *et al.*, 1980) em grupos populacionais diversos. Outro estudo realizado em recém-nascidos de uma maternidade de Salvador-BA demonstrou frequência de 9,8% para o genótipo AS, 0,9% para o SC e 0,2% para o SS (ADORNO *et al.*, 2005).

Em estudo proveniente da triagem neonatal realizada pela APAE (Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais) na região do Recôncavo Bahiano foram descritas as frequências de 9,5 e 11,4% para portadores de hemoglobina S e de 1,24% de pacientes homozigotos para hemoglobina S (SILVA *et al.*, 2006).

1.2 ANEMIA FALCIFORME

1.2.1 DEFINIÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A anemia falciforme é uma doença genética autossômica recessiva que acomete milhões de indivíduos no mundo, sendo considerada um problema social e de saúde pública. Ela ocorre devido à presença de Hb S em homozigose (SS), levando a uma série de alterações nos eritrócitos, que por sua vez originam as manifestações clínicas presentes nessa patologia. Os indivíduos heterozigoto para a HbS (AS) são assintomáticos.

Os portadores de anemia falciforme apresentam anemia hemolítica grave, com eventos vaso-oclusivos constantes; caracterizados por lesões tissulares, isquemia/reperfusão e por inflamação, acompanhado por quadro clínico heterogêneo (LEE. *et al*, 1992). Alguns portadores apresentam gravidade clínica elevada com retardo no crescimento e desenvolvimento, bem como alterações em vários órgãos, sempre em decorrência da hemólise contínua, dos fenômenos vaso-oclusivos e hospitalizações freqüentes, enquanto outros apresentam quadro clínico menos grave. Outros fatores também têm sido relacionados à heterogeneidade clínica presente na doença, entre eles os fatores ambientais, tais como o nível sócio-econômico e estado nutricional, além de fatores genéticos, como os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β e a presença de talassemia α (GONÇALVES *et al.*,1994; EMBURY, 1995; WEATHERALL & PROVAN, 2000).

A HbS tem características físico-químicas diferentes da hemoglobina normal, isso ocorre devido a troca do sexto aminoácido da cadeia polipeptídica beta, com substituição do ácido glutâmico por valina, gerando com isso à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina. Além disso, apresenta diferença na estabilidade

e solubilidade, o que leva a formação de polímeros quando no estado de desoxihemoglobina (BUNN *et al.*, 1986). Entre os fatores que influenciam na extensão e velocidade de formação dos polímeros de HbS têm sido constantemente descritos a concentração intracelular de HbS, o grau de desoxigenação e a concentração de HbF (BUNN *et al.*, 1997).

As deformações que ocorrem no processo de falcização alteram as trocas iônicas, afetam a permeabilidade celular e como consequência, surgem lesões de membrana, contribuindo para a diminuição do tempo de vida dessas células. As alterações nas trocas iônicas, tais como a perda de íon potássio (K^+), contribuem para a desidratação celular (BALLAS *et al.*, 1996). A perda da elasticidade da célula está associada ao aumento da concentração de HbS intracelular, resultando no aumento da viscosidade no citosol, à polimerização da HbS e rigidez da membrana (FABRY., *et al.*, 1991).

Outras condições parecem contribuir para a ocorrência de manifestações clínicas na anemia falciforme, tais como a adesão de hemácias falcizadas e leucócitos ao endotélio vascular; a expressão de moléculas de adesão (VCAM, ICAM); alterações na concentração de hemoglobina total e HbF; o aumento do número de leucócitos; ativação de monócitos e expressão de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (WANG & LUKENS, 1999; COSTA, 2001; OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2001; CONRAN *et al.*, 2004; STUART & NAGEL, 2004), concluindo-se que, o portador de anemia falciforme apresenta estado pró-inflamatório constante (HEBBEL & VERCELLOTTI, 1997; KUTLAR, 2005; REDDING-LALLINGER & KNOLL, 2006).

As manifestações clínicas mais freqüentes na anemia falciforme são trombooses, crises dolorosas, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA), priapismo, retinopatia, úlcera de perna, crise de hemólise aguda, crise de aplasia

medular, acompanhada de infecções graves devido à leucopenia; crise de seqüestração esplênica (frequentes em crianças), crise de insuficiência renal, insuficiência gonadal e hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (LEE *et al.*, 1992).

1.2.2 HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β^S

Os haplótipos são mutações silenciosas no DNA, onde existe padrão de combinações de sítios polimórficos para endonucleases de restrição. A determinação dos haplótipos no grupo de genes da globina β^S é extremamente importante, pois fornece elementos para análises antropológicas, estudos de genética populacional e apresenta valor prognóstico na avaliação clínica do paciente (ANTOARAKIS *et al.*, 1985; POWARS *et al.*, 1991).

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S são classificados em cinco tipos diferentes, de acordo com a origem e área geográfica onde predominam: Benin (Ben), que está associada à África Ocidental; Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental e CentroSul; Senegal (Sen) à África Atlântico Ocidental; Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental e Camarões (Cam) à Costa Ocidental Africana (NAGEL, 1984; SUTTON *et al.*, 1989) (Figura 1.A e B).

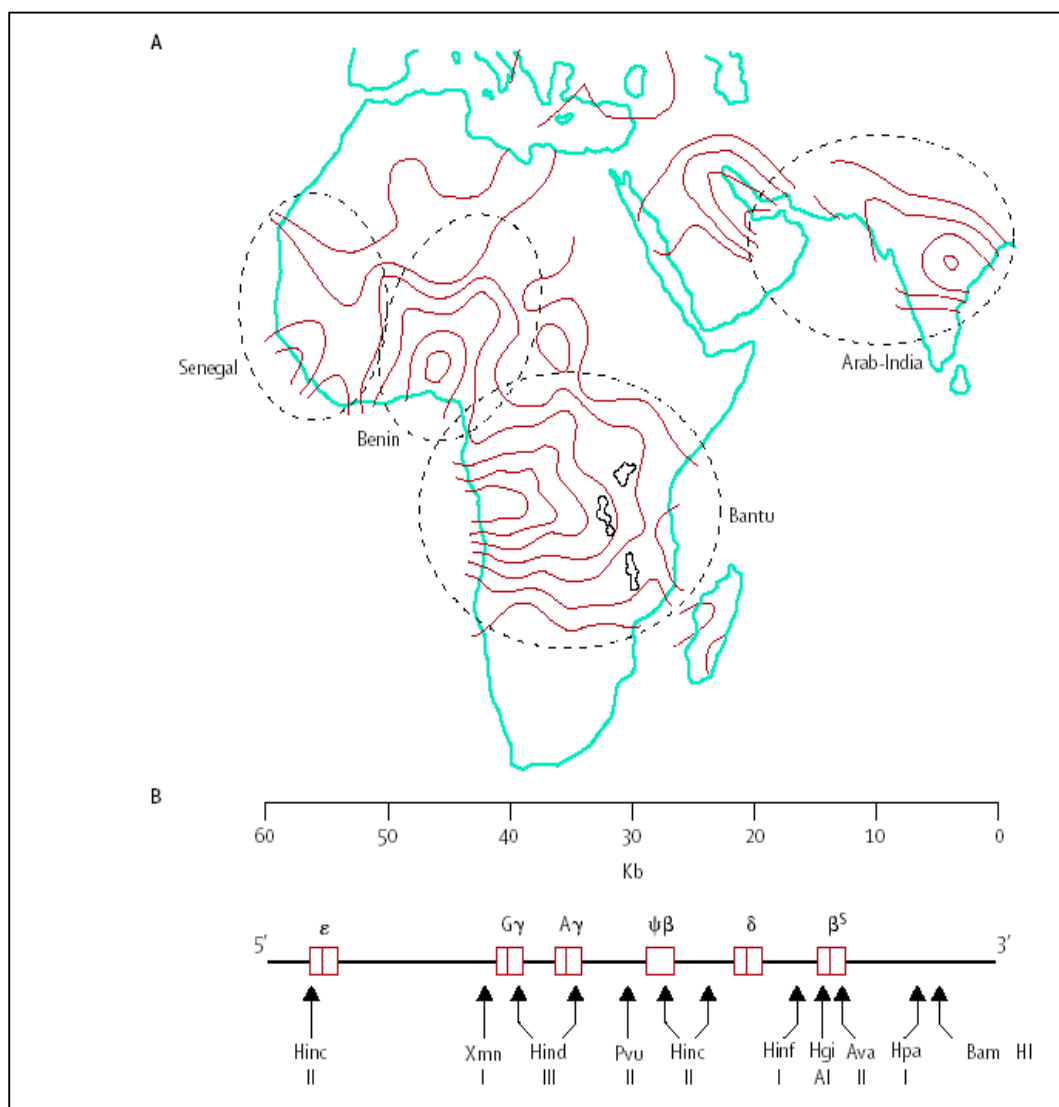


Figura 1. A - Distribuição geográfica dos haplótipos ligados ao grupo de gene da globina β^S na África e regiões do Oriente Médio. B - Sequência de polimorfismos gênicos localizados no cromossomo 11, demonstrando o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de STUART & NAGEL., 2004.

1.2.3 MODULAÇÃO CLÍNICA NA ANEMIA FALCIFORME

O prognóstico clínico na anemia falciforme pode ser influenciado por diversos fatores. A HbF é um fator importante, sendo que pacientes com níveis elevados de HbF

apresentavam evolução clínica menos grave, fato que tem levado a aplicação de terapias que visam o aumento da HbF. COSTA *et al* (2004) demonstram que existe diminuição nas crises álgicas e nas necessidades de transfusões sanguíneas e internações. Algumas terapias utilizam agentes citotóxicos (hidroxiuréia e 5-azacitidina); fatores de crescimento hematopoético (eritropoetina) e ácidos graxos de cadeia curta (butirato e derivados), uma vez que podem estimular a síntese de HbF (CHARACHE, 1990; STEINBERG & RODGERS, 2001; STUART & NAGEL, 2004).

Os haplótipos ligados aos grupos de genes da globina β^S também têm sido descritos por exercerem influência no curso clínico dos pacientes com anemia falciforme. O haplótipo Ben está associado a níveis intermediários de HbF e gravidade moderada da doença; o CAR a níveis diminuídos de HbF e quadro clínico mais grave, o Sen e o Saudí, a níveis elevados de HbF e curso clínico menos grave da doença (NAGEL, 1984; POWARS, 1991; RAHGOZAR *et al.*, 2000).

A associação de anemia falciforme com a talassemia α favorece o desenvolvimento de curso clínico menos grave (STEINBERG, 2001). A talassemia α e variações nos níveis de HbF não podem ser considerados como causa principal da modulação clínica da anemia falciforme, estudos recentes têm sugerindo possíveis candidatos genéticos a fatores moduladores da clínica na anemia falciforme. Esses novos candidatos são os mediadores inflamatórios, o estresse oxidativo, o óxido nítrico (NO), a vasoregulação, a interação célula-célula, a coagulação sanguínea, fatores de crescimento, citocinas, receptores e elementos transcricionais, justificando seu caráter multifatorial (STEINBERG, 2005).

As diferenças individuais de susceptibilidade aos eventos vaso-oclusivos em pacientes com anemia falciforme podem estar relacionadas a alterações no sistema de proteção contra os efeitos do estresse oxidativo causado pela hemoglobina livre no

plasma. Baseado nessa possibilidade, polimorfismos nos genes da haptoglobina estariam associados ao aumento de risco de complicações inflamatórias e conseqüentemente a eventos vaso-oclusivos.

1.3 HAPTOGLOBINA

1.3.1 ESTRUTURA E FUNÇÕES DA HAPTOGLOBINA

A haptoglobina (Hp) é uma α -2-sialoglicoproteína sérica que possui a capacidade de se ligar a Hb livre no plasma, impedindo a excreção renal de ferro e dano vascular decorrentes dos efeitos oxidativos da Hb livre. A Hp é uma proteína de fase aguda, cuja síntese hepática é induzida pelas citocinas interleucina-6 (IL-6), IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LANGLOIS *et al.*, 1996).

A Hp apresenta heterogeneidade molecular possuindo três fenótipos: Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2 (LANGE 1992). Essa proteína é constituída de duas cadeias polipeptídicas diferentes, duas cadeias leves (α) e duas cadeias pesadas (β) ligadas entre si por pontes de dissulfeto (S-S) (KOCH *et al.*, 2002). A cadeia β possui 245 resíduos de aminoácidos (40KDa), sendo a mesma em todos os três fenótipos. A cadeia α 1 possui 83 resíduos de aminoácidos, sendo ainda classificada em α^{1S} (“slow”) ou α^{1F} (“fast”), devido à diferenças nos aminoácidos das posições 52 e 53, sendo de aspargina e ácido glutâmico na cadeia α^{1S} , e ácido aspártico e lisina na cadeia α^{1F} (YANO *et al.*, 1998). A cadeia α^2 possui 142 resíduos de aminoácidos correspondendo a duas vezes mais o tamanho da cadeia α^1 . As três isoformas podem ser diferenciadas de acordo com a mobilidade eletroforética, com o fenótipo Hp1-1 apresentando a cadeia α^1 , enquanto que os fenótipos Hp2-1 e Hp2-2 apresentam a cadeia α^2 . (BOWMAN 1982).

A Hp1-1 é uma molécula pequena (86KDa), com a fórmula $(\alpha^1 \beta)_2$. O heterozigoto Hp2-1 é caracterizado pela polimerização $(\alpha^1 \beta)_2 + (\alpha^2 \beta)_n$ ($n=0,1,2,\dots$) e a Hp2-2 pela formação de polímeros de peso molecular elevado (>200KDa), apresentando a fórmula $(\alpha^2 \beta)_n$ ($n=3,4,5,\dots$) (figura 2). A concentração da Hp é dependente do fenótipo, onde os indivíduos que são Hp2-2 possuem proporcionalmente concentrações menores de Hp que os indivíduos Hp2-1 e Hp1-1 (LANGE. 1992).

A distribuição fenotípica da Hp pode variar de acordo com a localização geográfica da população em estudo, sendo que o sudeste da Ásia apresenta frequência diminuída do alelo Hp1(0,10) em relação à população indígena da América do Sul (0,80) (LANGLOIS et al., 1996). A distribuição do fenótipo da haptoglobina na população europeia é de aproximadamente 15% para indivíduos Hp 1-1, com 50% para os Hp2-1 e 35% para os Hp2-2, correspondendo a uma frequência de aproximadamente 0,40 para os alelos Hp1 (LOUAGIE., *et al*, 1996).

A principal função da Hp é a de se ligar à hemoglobina (Hb) formando um complexo solúvel. Essa ligação não é covalente, porém apresenta afinidade e estabilidade. Os eritrócitos possuem uma vida média de 100 dias na circulação, sendo que durante esse período percorrem uma grande rede vascular, sofrendo agressões de vários tipos. Ao atravessar a polpa vermelha do baço, os eritrócitos envelhecidos e com alterações nas membranas são então retidos nos sinusóides, onde se encontram os macrófagos, sendo então fagocitados no processo denominado de destruição extravascular. Esse processo fisiológico pode ocorrer de forma aumentada como no caso da anemia falciforme, onde os eritrócitos têm sua vida média diminuída em decorrência de alterações da forma e membranas (ZAGO *et al.*, 2004).

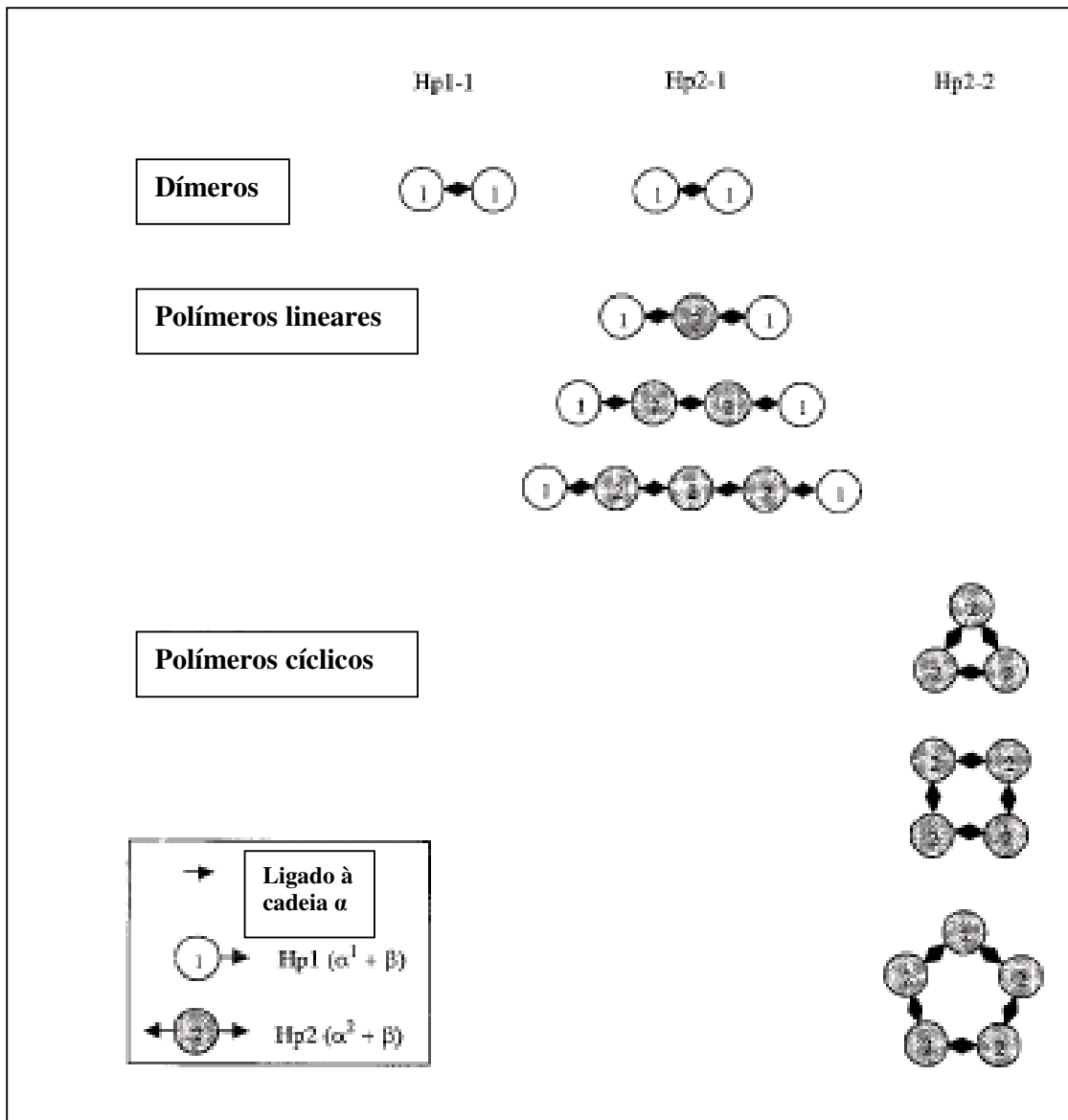


Figura 2. Mapa esquemático das diferentes estruturas da molécula da haptoglobina. A Hp1-1 se apresenta na forma de dímeros, a Hp2-1 em forma linear, as Hp2-2 na forma cíclica. Adaptado de VAN VLIERBERGHE, 2004.

O eritrócito sofre ação de enzimas presentes no citoplasma dos macrófagos, rompendo-se e liberando a hemoglobina, que é então dissociada em globina e no grupo heme. A globina é separada em aminoácidos que são reutilizados e o heme sofre ação de enzimas que levam a cisão do anel protoporfirínico, liberando o ferro e a bilirrubina. O ferro se liga a transferrina do plasma, sendo levado para a medula óssea, onde é reaproveitado. A bilirrubina é levada ao fígado ligada à albumina, onde ocorre a reação de conjugação com o ácido glucurônico. A bilirrubina conjugada é excretada na bile. (ZAGO *et al.*, 2004).

Além da destruição extravascular, há em condições fisiológicas a presença de hemólise intravascular, onde a hemoglobina pode ser encontrada no plasma e, devido ao baixo peso molecular (64,5KDa), passar do plasma para a urina (hemoglobinúria). A hemoglobina vascular livre é convertida rapidamente em metahemoglobina, que facilmente libera os grupos hemes e a globina. Quando ocorre a hemólise intravascular existe um sistema de proteção envolvendo as proteínas, hemopexina e a haptoglobina, que se ligam respectivamente ao heme e dímeros de hemoglobina, permitindo o *clearance* dessas substâncias pela via hepática no sistema retículo endotelial (ZAGO *et al.*, 2004).

O excesso de heme livre é um catalisador para formação de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que podem gerar injúria e disfunção celular. Os radicais livres (RL) são bioprodutos naturais do metabolismo oxidativo, sendo capazes de causar danos irreversíveis à membrana lipídica, às proteínas e aos ácidos nucléicos, lipofuscina e ditirosina no interior das células (BALLA *et al.*, 1991).

Os RL incluem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (-OH) e, os peróxidos de ácidos graxos. O mecanismo bioquímico de ação dos RL dá-se em função da instabilidade química que os elétrons livres lhe confere

(O₂- e -OH) ou, como no caso do H₂O₂ e dos peróxidos de ácidos graxos, pela facilidade com que geram RL em reações que, na presença de ferro (heme) produzem -OH. A fonte principal de RL provém da reação de Fenton, que converte H₂O₂ e O₂ em radicais hidroxilas catalisados pelo ferro. O principal dano causado pelos RL resulta diretamente da peroxidação de lipídeos, especialmente daqueles presentes na membrana celular, levando à perda de sua fluidez e à geração de lisofosfolipídeos. Isso ocorre devido ao fato do o heme ser lipofílico e de rapidamente intercalar-se com a bicamada lipídica, gerando danos à membrana e organelas, como mitocôndrias e núcleo, desestabilizando o citoesqueleto (BALLA *et al.*, 1991).

A Hp, então, exerce papel importante ao se ligar a Hb evitando a formação de RL, possuindo desta forma uma função de antioxidante. A habilidade antioxidante é fenótipo dependente, os polímeros de peso molecular elevado da Hp2-2 não atravessam as barreiras para fluídos extravasculares, conseqüentemente indivíduos Hp2-2 têm menor capacidade antioxidante (LANGE., 1992). A Hp também possui propriedades imunomodulatórias, podendo atuar de forma inibitória ou estimulatória da resposta imune (WASSEL, 2000; VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2004). Alterações nos níveis séricos de Hp podem ocorrer em algumas patologias, com elevação em pacientes com inflamação, infecções e em tumores, sendo que ocorre a diminuição em crises hemolíticas, como presentes em pacientes com anemia falciforme (LANGLOIS & DELANGHE, 1996; DOBRYSYCKA, 1997).

1.3.2 OS POLIMORFISMOS GÊNICOS DA HAPTOGLOBINA

Os genes que são responsáveis pela codificação das cadeias α e β da Hp são dois alelos autossômicos codominantes, *Hp1* e *Hp2*, localizados no braço longo do

cromossomo 16 (16q22) (MCGILL *et al.*, 1984). Esses alelos formam um único mRNA que leva a formação de uma cadeia única que será posteriormente clivada (RAUGEI *et al.*, 1983; KOCH *et al.*, 2003). O que diferencia os dois alelos é o fato da *Hp2* apresentar aproximadamente 1700 pares de base (bp), não presentes no *Hp1*, fato que se deve a uma duplicação parcial do alelo *Hp1* (KOCH *et al.*, 2002).

Acredita-se que a formação do alelo *Hp2* seja consequência de um evento de crossing-over desigual ocorrido na meiose entre os éxons 3 e 4 dos genes *Hp1F* e *Hp1S*, de forma que os resíduos homólogos presentes em cada seqüência específica desses genes são repetidos *in tandem* no gene *Hp2*, isto é, os éxons 5 e 6 de *Hp2* equivalem aos éxons 3 e 4 de *Hp1* (*Hp1S* ou *Hp1F*). Desta forma, o gene *Hp2* possui 7 éxon, enquanto o gene *Hp1* possui somente 5 (RAUGEI *et al.*, 1983; KOCH *et al.*, 2003) (figura 3).

Os polimorfismos nos genes da Hp são comuns em humanos, sendo caracterizados pelos alelos *Hp1* e *Hp2*, o que vai determinar a síntese de 3 fenótipos de Hp estruturalmente e funcionalmente distintos (*Hp1-1*, *Hp2-1* e *Hp2-2*) (MAEDA *et al.*, 1984). As combinações entre esses alelos constituem 6 possíveis genótipos distintos e seus correspondentes fenótipos: *Hp1S-1S*, *Hp1S-1F*, *Hp1F-1F*, *Hp2-1S*, *Hp2-1F*, *Hp2-2*. Essa identificação pode ser realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). (YANO *et al.*, 1998).

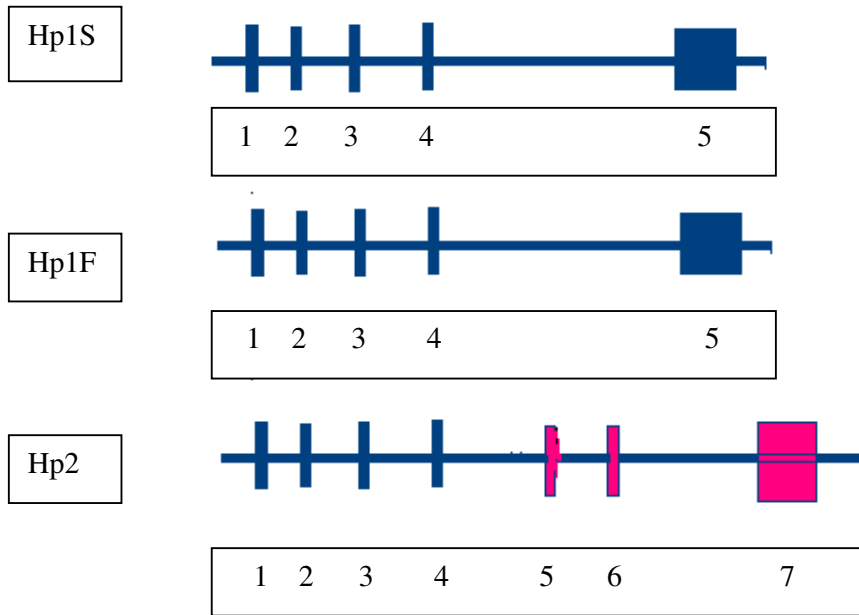


Figura 3. Representação esquemática da estrutura dos genes da Hp. Os boxes indicam os éxons. Adaptado de YANO *et al.*, 1998.

1.3.3 POLIMORFISMOS DA HAPTOGLOBINA EM ALGUMAS PATOLOGIAS

Comparando os fenótipos Hp1-1 e Hp2-2, o primeiro apresenta atividade antioxidante melhor, força maior de ligação à hemoglobina livre e inibe mais fortemente a síntese das prostaglandinas que o Hp2-2, porém este apresenta atividade angiogênica elevada quando comparada aos outros fenótipos. O Hp2-1 possui atividade funcional de nível intermediário (FADLON *et al.*, 1998).

Os fenótipos da haptoglobina estão associados a prevalência de algumas doenças, sendo o fenótipo Hp2-2 diretamente associado ao risco elevado de infarto do miocárdio e o Hp1-1 com a proteção contra complicações vasculares no diabetes mellitus (MELAMED-FRANK M. *et al.*, 2001).

Estudo realizado por SULEIMAN *et al.*, (2005) em indivíduos que sofreram infarto agudo do miocárdio e que apresentavam diabetes, os autores observaram que os pacientes com diabetes que possuíam os fenótipos Hp2-1 ou Hp2-2 apresentavam risco elevado de infarto, fato que explicou parcialmente a mortalidade elevada entre os participantes. Diferentemente, os pacientes com diabetes que possuíam os fenótipos Hp1-1 possuíam ocorrência de infarto comparável a descrita em indivíduos não diabéticos.

O genótipo Hp2-2 é um fator de risco para a reciclagem do ferro e em alterações nas funções do sistema imune em crianças com anemia em regiões endêmicas de malária, já que a malária causa hemólise e liberação de hemoglobina e heme livre no plasma. Os polímeros de Hp2-2 têm menor capacidade de se ligar a Hb, apresentando diminuição na atividade antioxidante. Esses dados foram obtidos em um estudo de coorte realizado em 780 crianças (2-6 anos) da região rural de Gâmbia durante epidemia de malária (ATKINSON *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que os polimorfismos da haptoglobina podem ter uma função em várias infecções virais, incluindo a AIDS e hepatite C (LOUAGIE., *et al.*, 1996, & DELANGHE., *et al.*, 1998). Estudos iniciais em adultos infectados pelo HIV-1 demonstraram que o fenótipo Hp2-2 está associado a proporção elevada de mortalidade, tempo diminuído de sobrevivência desde o diagnóstico (Hp2-2 até 7,33anos; Hp2-1/1-1 até 11,0 anos), níveis elevados de RNA de HIV-1 no plasma entre indivíduos em uso de antiretrovirais e acúmulo de ferro e oxidação da vitamina C, sugerindo que estes apresentam eficiência diminuída na proteção contra o estresse oxidativo da Hb/ferro, o que pode ser um mecanismo para estimulação da replicação viral.

O estresse oxidativo induzido pelos radicais de oxigênio reativo estimula a replicação do HIV através da ativação da transcrição do fator- κ B contribuindo para o

dano celular e a imunodeficiência (GORDEUK., *et al.*, 2001). Entretanto, em estudos mais recentes realizados em pacientes com AIDS no Brasil não foram observadas associação entre o genótipo da Hp e a gravidade da doença (ZACCARIOTTO *et al.*, 2006).

1.4 CITOCINAS

As citocinas são definidas como um grupo heterogêneo de pequenos polipeptídeos solúveis (~25KDa) ou mediadores glicoprotéicos, que são responsáveis por um trabalho complexo de regulação da resposta imune e inflamatória (BORISH., 2003). As citocinas usualmente atuam no micro-ambiente local com ação autócrina ou de forma parácrina, agindo no comportamento de células adjacentes. As citocinas possuem também ação endócrina, afetando o comportamento de células distantes, o que depende diretamente da sua meia vida (JANEWAY *et al.*, 2001).

A síntese de citocinas é realizada pelo sistema de sinalização que envolve a ligação da citocina ao seu receptor específico na célula alvo, desencadeando a transdução de sinais intracelulares na célula efetora da resposta (BIDWELL *et al.*, 1998). Portanto, a ligação de citocinas a receptores específicos, inicia a transdução de sinais e vias secundárias dentro da célula alvo, o que pode resultar na ativação de genes responsáveis pela divisão celular, crescimento, diferenciação, migração ou apoptose (CARPENTER *et al.*, 1998).

1.4.1 A ANEMIA FALCIFORME E O TNF- α , IL-1 β E IL-6.

A IL-1 e o TNF- α são pequenos polipeptídeos com aproximadamente 17Kd, responsáveis por vários efeitos na resposta imunológica, inflamação, metabolismo e hematopoiese (OPPENHEIM., 2001). A IL-1 foi inicialmente descrita como “pirógeno endógeno” e o TNF- α também foi referido como caquecina. A IL-6 pertence a família das hematopoetinas e apresenta como efeitos locais a ativação de linfócitos e o aumento na produção de anticorpos e alterações sistêmicas como febre e proteínas de fase aguda. O TNF- α e a IL-6 produzidos pelos macrófagos, quando presente na região onde está ocorrendo a vaso-occlusão, estimula o fígado a produzir proteínas de fase aguda (JANEWAY *et al.*, 2001).

O estado inflamatório crônico é uma característica importante que ocorre na anemia falciforme e em outras síndromes hemolíticas crônicas, predizendo a gravidade da doença. A inflamação, a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e a lesão endotelial parecem contribuir para a patogênese da anemia falciforme. Os episódios repetidos de isquemia/reperfusão e as contagens elevadas de leucócitos no sangue foram relacionados aos eventos de morbidade presentes na doença (WAGNER *et al.*, 2003).

A leucocitose é um fator de risco na anemia falciforme, estando associada a presença de crises hemorrágicas em crianças e adultos, síndrome torácica aguda e mortalidade elevados (CASTRO *et al* 1994; PLATT *et al* 1994). Além disso, ocorre elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1(IL-1 β), bem como a expressão aumentada de moléculas da adesão (ICAM, VCAM, integrinas e P-selectina) e o aumento de biomarcadores inflamatórios como a proteína C reativa (FRANCIS *et al.*, 1992).

A hemoglobina livre no plasma aumenta o consumo do NO, o que vai resultar na liberação e transcrição de moléculas de adesão, incluindo VCAM-1, E-selectina e a vasoconstrição por fatores semelhantes à endotelina-1. O heme está também associado à indução da expressão de moléculas de adesão, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina nas células endoteliais, o que resulta em ligação intensa entre as células do sangue e o endotélio, com uma atividade pró-inflamatória significativa do heme, considerado um elemento importante na patogênese dos fenômenos vaso-oclusivos presentes na anemia falciforme (WAGNER *et al.*, 2003).

Essas conclusões são baseadas em várias evidências, entre elas, o fato de haver expressão elevada da molécula de adesão VLA-4 e CD36 nos reticulócitos das células falciformes, o que explica a forte ligação desses reticulócitos aos seus ligantes (VCAM-1 e LDL oxidado). Deste modo, o heme induz a expressão de VCAM-1 e catalisa a oxidação do LDL (CAMEJO *et al.*, 1998).

O heme livre, bem como a hemoglobina, ativam plaquetas e monócitos que liberam IL-1 β e TNF- α , que estão associados com a vaso-oclusão, enquanto o NO inibe essa ativação. Então, o heme livre e o consumo de NO vão favorecer a vaso-oclusão (FADLON *et al.*, 1998 e NELLY *et al.*, 1984). Existe uma associação entre gravidade da doença apresentada pelos pacientes com anemia falciforme, o aumento da concentração do heme na membrana dos eritrócitos falcizados e a diminuição da vida útil dos eritrócitos (WAGENER *et al.*, 2003).

JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme acomete milhões de pessoas no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública. A Bahia possui uma população que apresenta mistura racial elevada (índios, negros e caucasóide de origem européia), gerando características genótípicas únicas. No Brasil, a Bahia é o estado que possui a frequência mais elevada de indivíduos AS, com frequências de 4,7% a 15,7% (AZEVEDO *et al.*, 1980) em vários grupos populacionais. Adorno *et al* (2005) descreveram frequências de 9,8% para os AS; 0,9% para os SC e 0,2% para os SS ao estudarem recém-nascido de uma maternidade pública de Salvador-Ba. Silva *et al.* (2006) descreveram em estudo realizado na triagem neonatal no recôncavo baiano no período de 2001 a 2003, a frequência de 6,0% (2001), 4,9% (2002) e 8,3 (2003) de indivíduos AS.

Além disso, a anemia falciforme é uma patologia que tem uma frequência elevada de eventos vaso-oclusivos (GONÇALVES *et al.*,1994). Sendo assim, é proposto o estudo de polimorfismos presentes em genes da haptoglobina, molécula envolvida no sistema de proteção contra a hemoglobina livre no plasma, em pacientes com anemia falciforme, visando investigar possíveis associações com episódios inflamatórios e de vaso-oclusão, níveis de citocinas como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 e genótipos para a haptoglobina.

A realização deste estudo contribuirá para o estabelecimento da frequência dos polimorfismos gênicos da haptoglobina em portadores de anemia falciforme em Salvador- Bahia e da avaliação de uma possível participação destes como fatores prognósticos no desenvolvimento clínico da doença.

OBJETIVO GERAL E

ESPECÍFICOS

3 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de polimorfismos em genes da haptoglobina (*Hpl* e *Hp2*) em um grupo de portadores de anemia falciforme em estado estável da doença e em pacientes internados em crise vaso-oclusiva, correlacionando aos níveis séricos da citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 e dados clínicos.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de polimorfismos em genes da haptoglobina;
- Correlacionar os polimorfismos gênicos da haptoglobina à frequência dos fenômenos vaso-oclusivos e processos inflamatórios;
- Determinar os níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α ;
- Investigar de frequência de talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$;
- Investigar os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S;
- Associar os polimorfismos gênicos da haptoglobina aos dados hematológicos, níveis de hemoglobina fetal (Hb F), frequência de talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$, a frequência haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S, os níveis séricos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e fenótipos apresentados pelos portadores da anemia falciforme envolvidos no estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Foi desenvolvido um estudo é ambispectivo, em uma casuística composto por 141 portadores de anemia falciforme, sendo que 118 acompanhados regularmente no ambulatório de hematologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia-HEMOBA/SESAB, em estado estável da doença. Projeto foi aprovado pela a Comissão de Ética do CPqGM-FIOCRUZ-BA.. Foram incluídos no estudo pacientes com anemia falciforme que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I). Os critérios de exclusão no estudo foram a não assinatura do TCLE, pacientes com história recente de infecção (HIV, HTLV-1 e hepatites) e em regime de hipertransusão, no caso do grupo de pacientes em estado estável da doença e/ou análises de hemoglobinas não confirmatórias do perfil SS. A coleta de sangue foi realizada durante a consulta ambulatorial e os dados clínicos foram obtidos através de busca retrospectiva aos prontuários médicos, e entrevista aos pacientes (Anexo II).

O período retrospectivo foi desenvolvido durante 1992 a 2005 em pacientes com anemia falciforme em estado estável da doença. E os mesmos pacientes tiveram seus dados clínicos do prontuário coletados de maneira a obtermos um histórico clínico de cada indivíduo.

O segundo grupo foi composto por 23 portadores de anemia falciforme em idade pediátrica, internados no Hospital da Criança (HC) das Obras Sociais Irmã Dulce no período de agosto de 2005 a setembro de 2006. Nesse grupo foram incluídos pacientes menores internados por vaso-oclusão e/ou infecção, cujos responsáveis concordaram com a participação no estudo após a explicação e assinatura do TCLE (Anexo I). Foram excluídos desse grupo, pacientes que recusaram a coletar o sangue e o fato do

responsável não assinar o TCLE. A primeira coleta de sangue foi realizada nos primeiros dias de internação, quando o paciente se apresentava em crise de vaso-oclusão ou em estado inflamatório provocado por infecção, sendo esse grupo denominado de paciente hospitalizado por crise ou vaso-oclusão (PC); a segunda coleta de sangue foi realizada no dia da alta hospitalar, quando o paciente retomava ao seu estado estável, sendo esse grupo denominado paciente em alta hospitalar (PA). Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes.

Também foi incluído neste estudo um grupo de referência da população de Salvador, sendo composto por 171 indivíduos, provenientes do projeto Bahia Azul, que abrange uma amostra epidemiologicamente significativa da população de Salvador, onde foram realizadas as análises dos polimorfismos no gene da haptoglobina, tendo sido denominado Grupo de Referência (GR).

Todos os experimentos realizados seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei no. 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto no. 5.591 de 22 de novembro de 2005, seguindo as normas técnicas existentes no manual de Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz (Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ – Ministério da Saúde, 2005).

As amostras de sangue foram coletadas e enviados ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ) para a realização das análises moleculares, hematológicas e ensaio imunoenzimático (ELISA); e para o Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia da UFBA para análise do perfil de hemoglobinas (Figura 4).

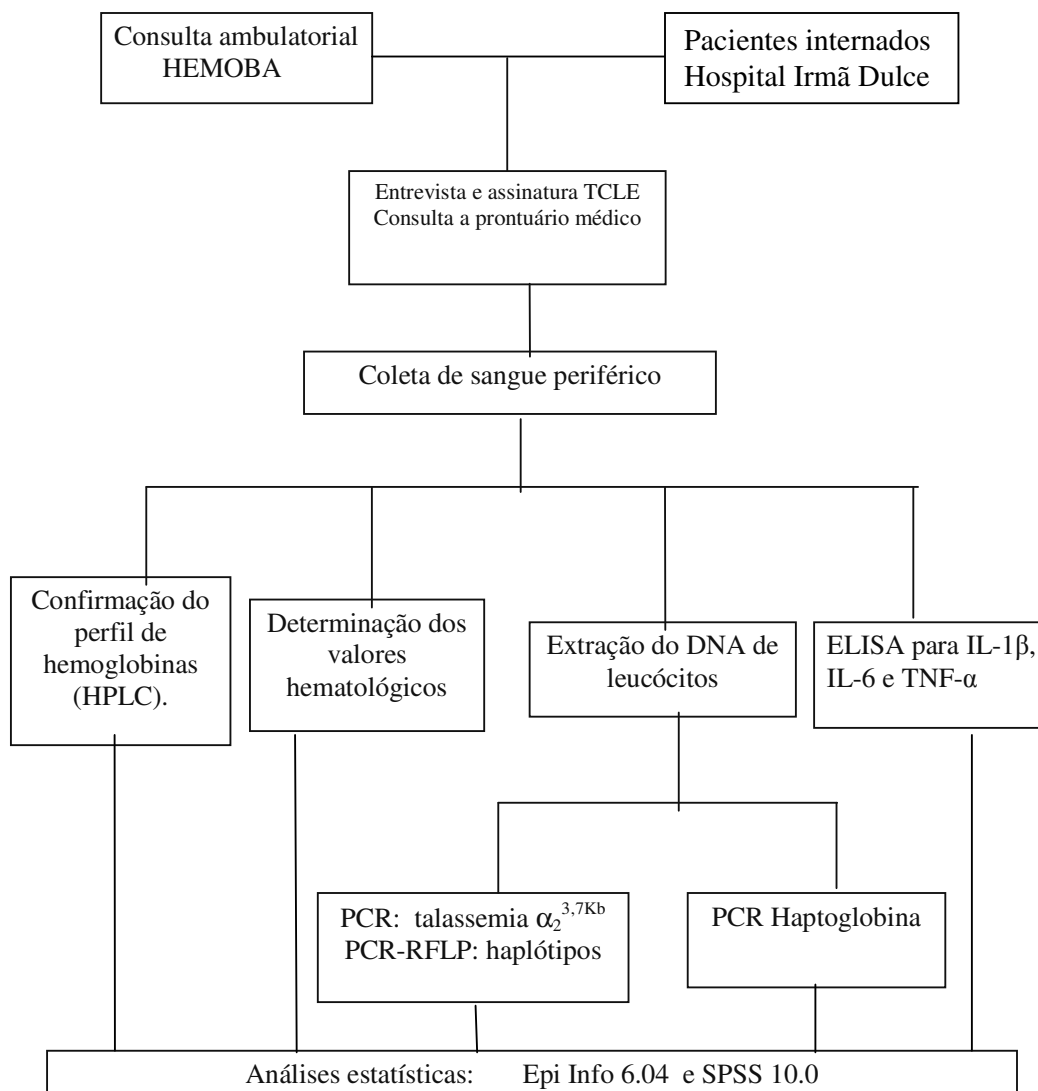


Figura 4. Representação esquemática do delineamento do estudo.

5.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletados 5mL de sangue de sangue venoso em EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico), na concentração de 1,5mg/mL (DACIE & LEWIS, 1984), para a determinação das análises hematológicas, de hemoglobinas e extração do DNA genômico. Também foram coletados 5mL de sangue venoso, em tubo sem aditivo, para

obtenção do soro destinado as dosagens das citocinas. O DNA genômico e o soro foram armazenados a -20 °C até a realização das dosagens pertinentes.

5.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E DE HEMOGLOBINAS

A determinação dos valores hematológicos e índices hematimétricos foram realizadas em contador automático (*COULTER COUNT, T890*) e a análise morfológica das hemácias pela observação microscópica de esfregaços sangüíneos corados pelo método de Wright (*DACIE & LEWIS, 1984*).

Os reticulócitos foram contados em esfregaços corados pelo azul de cresil brilhante (*DACIE & LEWIS, 1984*).

O perfil de hemoglobinas foi confirmado pela técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em equipamento automatizado (*Variant II- Bio-rad*).

5.4 ANÁLISE MOLECULAR

5.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi isolado de leucócitos a partir de 200µL de sangue, utilizando-se o método direto *QIAamp[®] DNA Mini Kit (Quiagen)*, conforme protocolo do fabricante.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β^S

Os haplótipos do grupo de genes da globina beta S foram investigados pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando oligonuclotídeos sintéticos

(*primers*) específicos, seguida por digestão dos fragmentos obtidos com enzimas de restrição (RFLP) (SUTTON *et al.*, 1989). Foram estudados quatro sítios de restrição, o Hind III no gene γ^G ; Hind III no gene γ^A ; Hinc II no gene $\psi\beta$ e Hinc II na posição 3' do gene $\psi\beta$ (Tabela 1). A reação foi desenvolvida em termociclador (*Eppendorf*) e a análise dos fragmentos foi realizada através de migração eletroforética das amostras em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X (tris-acetato - 0,04M; EDTA - 0,001M), corado pelo brometo de etídio (0,002%) e visualizado em transluminador sob luz ultravioleta.

Tabela 1-Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos inicializadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR, localização, tamanho dos fragmentos gerados e enzimas de restrição utilizadas nas reações de PCR e RFLP para a pesquisa dos polimorfismos em genes dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e talassemia $\alpha_2^{3.7Kb}$.

<i>Primers</i> 5' → 3'	Localização	Tamanho do Fragmento (pb)	Enzima de restrição
Sítio γ^G para haplótipo do gene da globina beta AAG-TGT-GGA-GTG-TGC-ACA-TG (direto) TGC-TGC-TAA-TGC-TTC-ATT-ACA-A (reverso)	Γg	780	<i>Hind</i> III
Sítio γ^A para haplótipo do gene da globina beta TGC-TGC-TAA-TGC-TTC-ATT-ACA-A (direto) TAA-ATG-AGG-AGC-ATG-CAC-ACA-C(reverso)	γ^A	760	<i>Hind</i> III
Sítio $\psi\beta$ para haplótipo do gene da globina beta GAA-CAG-AAG-TTG-AGA-TAG-AGA (direto) ACT-CAG-TTG-TCT-TGT-GGG-CT (reverso)	$\Psi\beta$	701	<i>Hinc</i> II

Sítio 3'ψβ para haplótipo do gene da globina beta	3'ψβ	590	Hinc II
TCT-GCA-TTT-GAC-TCT-GTT-AGC (direto)			
GGA-CCC-TAA-CTG-ATA-TAA-CTA (reverso)			
<hr/>			
Talassemia α₂^{3,7Kb}			
A: CCC-TCC-CCC-TCG-CCA-AGT-CCA-CCC-C (direto, para as reações mutante e normal)	5' Z box α ₂	1700	-
B: GGG-GGG-AGG-CCC-AAG-GGG-CAA-GAA (reverso mutante)	3' α ₁		
C: GGG-AGG-CCC-ATC-GGG-CAG-GAG-GAA-C (reverso normal)	5' γ ₁		
<hr/>			

5.4.3 DETERMINAÇÃO DA TALASSEMIA α₂^{3,7Kb}

A talassemia α₂^{3,7Kb} foi investigada pela técnica da reação de PCR (MULLIS & FALLONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988; ERLICH, 1989), utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) destinados à amplificação de seqüências específicas (Tabela 1).

A reação foi realizada utilizando os primers (12,5pmol) A + C (seqüência normal) e os primers (12,5pmol) A + B (seqüência mutante), contendo tampão Tris - HCl 50mM pH8,9; cloreto de magnésio (MgCl₂) 1,7mM; mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (200μM de dCTP + dGTP e 100μM de dATP + dTTP); 10% de glicerol; 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase recombinante e aproximadamente 0,5μg de DNA, em um volume final de 50μL. A reação foi composta por uma etapa inicial a 98°C por 3 minutos e 85 °C por 3 minutos; cinco ciclos de 98 °C por 30 segundos, 66 °C por 1minuto e 30 segundos e 72 °C por 2 minutos; e 30 ciclos a 96°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de 72°C por 15 minutos (FOGLIETTA *et al.*, 1996).

A análise de fragmentos foi realizada através de corrida eletroforética das amostras coradas pelo azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%)

em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (tris–acetato - 0,04M; EDTA - 0,001M), corado pelo brometo de etídio (0,002%) e visualizado sob luz ultravioleta. A cada reação foram colocados controles negativos e positivos, visando testar a presença de contaminantes e confirmação da qualidade da amostra, respectivamente. As reações realizadas com *primers* A + B e A + C amplificaram fragmentos de 1.700 pb (1,7 kb), tanto na presença como na ausência da deleção.

5.4.4 DETERMINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DA HAPTOGLOBINA

Os polimorfismos em genes da haptoglobina foram realizados pela reação de PCR, sendo que os primers utilizados estão enumerados na Tabela 2. Para o estudo do polimorfismo da haptoglobina foi realizada a reação em volume total de 50µL contendo tampão de amostra 1X (200mM TrisHCl pH 8,4; 500mM KCl; Invitrogen); 2,5mM de MgCl₂; 200µM de dNTPs; 25pmol de primers direto e reverso; 5U/µL de *Taq* DNA polimerase, e aproximadamente 1µL de DNA genômico. Após a desnaturação de 3 minutos a 95 °C, foram realizados 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 40 segundos, pareamento de primers a 55 °C por 1 minuto e a extensão a 72 °C por 2 minuto, seguidos por um período de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos obtidos nas reações foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1% ambos em tampão TAE 1X(tris–acetato - 0,04M; EDTA - 0,001M), corado pelo brometo de etídio (0,002%) e visualizado sob luz ultravioleta. Para testar a presença de contaminantes e qualidade da amostra foram incluídos controles negativos e positivos.

As reações entre os primers para amplificação de fragmentos de DNA são indicativas dos diferentes genótipos para a haptoglobina que estão enumeradas na tabela

3, sendo que os genótipos são determinados pela combinação da presença dos diferentes fragmentos: Hp1S-1S, Hp1S-1F, Hp1F-1F, Hp2-1S, Hp2-1F e HP2-2 (YANO et al., 1998).

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos inicializadores (*primers*) utilizados nas reações de PCR para identificação do genótipo da haptoglobina.

IDENTIFICAÇÃO	<i>Primers</i> 5' → 3'
F3	CAGGAGTATACACCTTAAATG
S2	TTATCCACTGCTTCTCATTG
C42	TTACACTGGTAGCGAACCGA
C72	AATTTAAAATTGGCATTTCGCC
C51	GCAATGATGTCACGGATATC

Tabela 3. Reação entre os diferentes pares de primers e a identificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na reação de PCR para identificação dos genes da haptoglobina.

REAÇÃO	<i>Primers</i>	Tamanho do Fragmento (pb)
2	F3-C42	935
S	C51-S2	1200
F	F3-C72	1400

5.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

5.5.1 NÍVEIS DE IL-1 β

Os níveis séricos de IL-1 β foram dosados pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) utilizando anticorpos de detecção e de captura *Human IL-1 β ELISA Set (BD OptEIA - Biosciences)*. Para a IL-1 β foi utilizado anticorpo monoclonal

de captura anti-IL-1 β humano na concentração de 2 μ g/mL e anticorpo de detecção monoclonal biotilado anti-IL-1 β humano na concentração de 1 μ g/mL. A curva padrão teve 8 pontos em diluição seriada de 1:2 com ponto inicial de 250 pg/mL e ponto final de 3,9 pg/mL.

Para a dosagem de IL-1 β as amostras foram aplicadas em duplicata, seguindo o protocolo descrito abaixo, conforme orientação do fabricante:

- **Sensibilização da placa:** A placa de 96 poços foi sensibilizada com 100 μ L/poço do anticorpo monoclonal de captura anti-IL-1 β humano diluído em solução Na₂HO₄ 0,1M pH 9,0 na concentração de 2 μ g/mL incubada por 12 horas à 4^oC;
- **Lavagem:** foram realizadas lavagens com PBS/Tween 0,05% (tampão salina fosfatado acrescido de albumina bovina sérica a 1% e Tween 20 0,05%), sendo cada placa lavada por 3 vezes;
- **Bloqueio:** Após remover a solução com anticorpo de captura foram adicionados 200 μ L/poço do tampão de bloqueio (tampão salina fosfatado acrescido de albumina bovina sérica a 1% - PBS/BSA 1%). Incubação por 1 hora à temperatura ambiente;
- **Lavagem:** foram realizadas lavagens com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes;
- **Padrões, controles e amostras:** Foram distribuídos 100 μ L/poço do padrão IL-1 β humano recombinante na diluição 1:2 até 1:256 e 100 μ L/poço do soro dos pacientes em duplicata. Também foram incluídos o branco da reação, um controle positivo e um negativo (PBS/BSA 1% Tween 0,05%), sendo as reações incubadas por 2 horas a temperatura ambiente;
- **Lavagem:** foram realizadas lavagens com PBS/Tween 0,05% sendo cada placa lavada por 5 vezes;

- **Detecção:** Foram adicionados à placa, 100µL/poço do anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1β humano diluído em PBS/BSA1%Tween 0,05% na concentração de 1µg/mL. Após esta etapa foi realizada incubação durante 1 hora a temperatura ambiente;
- **Lavagem:** foram realizadas a lavagens com PBS/Tween 0,05% sendo cada placa lavada por 5vezes;
- **Conjugado:** Nesta etapa foram adicionados 100µL/poço do conjugado HRP-streptavidina (SAv-HRP), diluído em PBS/BSA 1% Tween 0,5% na concentração de 1:2000 e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente;
- **Lavagem:** foram realizadas lavagens com PBS/Tween 0,05% sendo cada placa lavada 7vezes;
- **Substrato:** o substrato (TMB em tampão citrato fosfato e H₂O₂) foi preparado 20 minutos antes de ser utilizado, 100µL do substrato/poço, seguido de incubação a temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos.
- **Solução de parada:** A reação de cor foi parada pela adição de 50µL/poço de H₂SO₄ a 8N. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 450nm.

5.5.2 NÍVEIS DE IL-6

Os níveis séricos de IL-6 foram dosados pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) utilizando anticorpos de detecção e de captura *Human IL-6 ELISA Set (BD OptEIA - Biosciences)*. Para a IL-6 foi utilizado anticorpo monoclonal de captura anti-IL-6 humano na concentração de 2µg/mL e anticorpo de detecção

monoclonal biotilado anti-IL-6 humano na concentração de 1µg/mL. A curva padrão teve 8 pontos em diluição seriada de 1:2 com ponto inicial de 300 pg/mL e ponto final de 4,7pg/mL.

Para a dosagem de IL-6 as amostras foram aplicadas em duplicata, seguindo o mesmo protocolo da ELISA para IL-1β.

5.5.3 NÍVEIS DE TNF-α

Os níveis séricos de TNF-α foram dosados pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) utilizando anticorpos de detecção e de captura *Human IL-6 ELISA Set (BD OptEIA - Biosciences)*. Para a TNF-α foi utilizado anticorpo monoclonal de captura anti-TNF-humano na concentração de 2µg/mL e anticorpo de detecção monoclonal biotilado anti-TNF-α humano na concentração de 1µg/mL. A curva padrão teve 8 pontos em diluição seriada de 1:2 com ponto inicial de 300 pg/mL e ponto final de 4,7pg/mL.

Para a dosagem de TNF-α as amostras foram aplicadas em duplicata, seguindo o mesmo protocolo da ELISA para IL-1β.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas EPI INFO versão 6.04 e SPSS versão 10. O teste estatístico paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise de variáveis quantitativas ou numéricas com distribuição normal, sendo os

resultados confirmados pelo pós-teste de Bonferroni. Para as distribuições fora da distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise de variáveis qualitativas ou categóricas foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (X^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Na presença de valores inferiores a 4, as análises foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis. As análises de correlação foram realizadas utilizando os coeficientes de Pearson para os dados de distribuição contínua e os coeficientes de Kendall's tau-b e Spearman para os dados categorizados. As análises multivariadas foram realizadas tendo como base os valores de F e níveis de significância para os testes de Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace e Roy's Largest Root. A análise de regressão linear foi realizada tendo como base o valor de F e os níveis de significância para o teste de hipóteses nulas. Os valores de $p < 0,05$ (5%) foram considerados significativos para as análises realizadas.

RESULTADOS

Foram analisados 312 indivíduos separados em três grupos: 118 portadores de anemia falciforme em estado estável (PE) e 23 internados por crise (PC); também foi incluído no estudo um grupo de referência 171 indivíduos normais proveniente do estudo do projeto Bahia azul realizado na cidade de Salvador. Entre os pacientes do grupo PE, somente 98 tiveram a avaliação do perfil hematológico destes 96 realizaram o genótipo da haptoglobina (Hp).

O grupo PE apresentava idade média de 14,5 (\pm 12,4) anos e o grupo PC apresentava idade média de 7,7 (\pm 3,6) anos. As análises dos dados hematológicos desses indivíduos estão representadas na tabela 4. Os dados hematológicos dos pacientes pediátricos com anemia falciforme (idade<21) demonstraram que a variável contagem de leucócitos se apresentou elevada, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 4: Distribuição dos dados hematológicos de portadores de anemia falciforme em estado estável da doença e internados.

	PE N=98 Média \pm desvio padrão	PC N=23 Média \pm desvio padrão	Valores de Referências
Ht %	22,8 \pm 4,2	22,9 \pm 3,6	35-53
Hb g/dL	8,5 \pm 7,7	7,2 \pm 1,2	12,0-17,5
HbS %	82,0 \pm 12,6	74,0 \pm 16,1	-
HbF %	10,5 \pm 6,9	8,7 \pm 5,6	0- 2,5
VCM fl	84,3 \pm 13,0	86,5 \pm 5,9	80-100
HCM pg	27,7 \pm 3,7	27,4 \pm 2,1	26,0-34,0
Reticulócitos %	6,3 \pm 4,4	9,2 \pm 4,7	0,5-1,5
Leucócitos	15,2 \pm 9,8	23,4 \pm 8,3	3,5-10

PE=Paciente em estado estável PC=Pacientes internados em crise

Na análise multivariável a relação entre contagem de reticulócitos e sequestro esplênico apresentou valores estatisticamente significativos ($p=0,039$; $F=4,45$).

Tabela 5: Distribuição dos dados hematológicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme em estado estável e internados.

	PE (81) Média (\pm desvio padrão)	PC (23) Média (\pm desvio padrão)	P*
Ht %	22,8 (\pm 4,3)	22,9 (\pm 3,5)	0,9188
Hb g/dL	8,6 (\pm 8,4)	7,3 (\pm 1,3)	0,1844
HbS %	82,1 (\pm 11,8)	75,8 (\pm 14,0)	0,0326
HbF %	11,0 (\pm 7,3)	8,7 (\pm 5,6)	0,1655
Reticulócitos %	6,9 (\pm 4,3)	9,3 (\pm 4,7)	0,0227
Leucócitos (X1000)	15,8 (\pm 10,4)	23,5 (\pm 8,4)	0,0015

*Mantel-Haenszel; PE=Paciente em estado estável PC=Pacientes internados em crise.

6.1 HAPLÓTIPOS LIGADOS AO GRUPO DE GENES DA GLOBINA β^S , TALASSEMIA α , CITOCINAS E FENÓTIPO

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S foram investigados, sendo que o haplótipo CAR foi encontrado em 61,8% (PE) e 56,5% (PC); o Ben em 74,6% (PE) e 74% (PC). A distribuição do genótipo entre os grupos de pacientes estudados está descrita na tabela 6.

Tabela 6: Distribuição dos genótipos dos haplótipos ligados aos grupos dos genes da globina β^S em portadores de anemia falciforme em estado estável e internado por crise.

Haplótipo	Grupo PE N (%)	Grupo PC N (%)	Total N (%)
CAR / CAR	22 (21,6)	3 (13,0)	26 (20,3)
CAR/ Ben	41 (40,2)	10 (43,5)	51 (39,8)
Ben/Ben	31 (30,4)	7 (30,5)	38 (31,3)
Ben/Cam	2 (2,0)	-	2 (1,6)
Atípico	6 (5,9)	3 (13,0)	9 (7,0)
Total	102 (100)	23 (100)	125 (100)

Os dados apresentados na tabela 7 demonstram a análise da distribuição dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e os dados hematológicos em portadores de anemia falciforme em estado estável, demonstrando diferenças estatísticas nos índices hematimétricos de VCM (volume corpuscular médio), sendo maiores no genótipo Ben/Ben e menores no genótipo Ben/Cam .

Tabela 7. Distribuição dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e dados hematológicos em portadores de anemia falciforme em estado estável.

	CAR/CAR	CAR/Ben	Ben/Ben	Ben / Cam	Atípico	Valor p
Frequência	22(21,6%)	41(40,2%)	31(30,4%)	2(2,0%)	6(5,9%)	
Ht %	22,6 ± 2,8	23,3 ± 4,2	22,8 ± 5,4	22,6±0,07	20,9 ± 1,2	0,444*
Hb g/dL	7,6 ± 1,0	9,8 ± 12,1	7,8 ± 1,4	7,9 ±0,5	7,0 ± 0,4	0,755*
HbS %	83,8 ± 11,6	81,0 ±14,0	81,0 ± 14,0	79,6±6,2	87,6 ± 3,5	0,546*
HbF %	7,7 ± 4,7	11,4 ± 8,6	11,4 ± 5,9	14,5±3,7	7,4± 2,2	0,141*
VCM fl	87,7± 6,3	79,9 ±16,7	88,5 ± 9,6	62,2±2,6	86,4 ± 6,4	0,019*
HCM pg	27,4 ± 1,8	25,9 ± 3,9	30,7 ± 3,2	32,0±0,0	29,7 ± 2,4	0,079
Reticulócitos %	5,4 ± 3,2	8,4 ± 4,4	5,6 ± 4,9	1,3±0,0	5,1 ± 2,4	0,051*

* ANOVA confirmada pelo pós-teste de Bonferroni

A análise multivariada entre os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S e HbF em pacientes estáveis que apresentavam HbF com níveis superiores a 10% demonstrou valores estatisticamente significantes (p=0,011, nos testes Pillai's Trace, Wilkis` Lambda, Hotelling`s Trace e Roy`s Largest Root).

A análise da distribuição dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S e os dados hematológicos em portadores de anemia falciforme internados em crise estão

apresentados na tabela 8, demonstrando que os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Tabela 8. Distribuição dos haplótipos ligados ao gene da globina β^S e dados hematológicos em portadores de anemia falciforme internado em crise.

	CAR/CAR	CAR/Ben	Ben/Ben	Atípico	Valor p
Frequência					
N(%)	3(13,0)	10(43,5)	7(30,5)	3(13)	
Ht %	22,7±2,9	22,0±3,4	24,3±4,0	22,8±5,2	*0,770
Hb g/dL	7,6±1,2	6,9±1,2	7,6±1,5	7,2±1,3	*0,762
HbS %	71,0±15,6	73,8±18,9	73,6±12,2	77,8±22,4	*0,833
HbF %	7,0±8,6	9,1±4,8	10,7±6,6	4,1±3,6	*0,319
VCM fl	87,7±0,0	85,1±6,4	92,4±0,0	-	*0,611
HCM pg	29,8±0,0	26,4±1,9	29,1±0,0	-	*0,167
Reticulócitos %	4,1±1,0	8,9±3,4	10,2±7,2	13,8±2,6	*0,133

* ANOVA confirmada pelo pós-teste de Bonferroni

Quando foi analisada a história clínica e os genótipos da globina β^S em indivíduos do grupo PE (tabela 9), a crise vaso-oclusiva foi mais freqüente no genótipo CAR/Ben, Ben/Ben e CAR/CAR ($p < 0,05$), sendo os resultados confirmados pela análise de correlação ($p = 0,043$, testes Kendall's tau_b e Spearman's rho). Nas infecções, somente as do trato respiratório superior foram mais freqüentes no genótipo Ben/Ben 11/30 (35,5%), seguido pelos 9/41 CAR/Ben (21,9%) e CAR/CAR 3/21(13,0%), no entanto não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 9. Distribuição dos genótipos da globina β^S e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme em estado estável da doença.

Genótipo N	CAR / CAR 23	CAR / Ben 41	Ben / Ben 31	CAR/Cam 2	Atípico 6	*p
Crise vaso- oclusivas N(%)	21 (91,3)	34 (82,9)	30 (96,7)	2 (100)	3 (50)	0,022
Episódio de crise Média± SD	4,4 ± 4,7	3,3± 2,8	3,6 ± 2,3	4,5 ± 0,7	6,0 ± 4,5	-
Transfusão N(%)	17 (73,9)	34 (82,9)	21(67,7)	2 (100)	5 (83,3)	0,38
ITRS N(%)	3 (13,0)	9 (21,9)	11 (35,5)	1 (50,0)	1 (16,7)	-
Pneumonia e broncopneumo nia N(%)	4 (17,4)	8 (19,5)	5 (16,1)	1 (50,0)	-	-
Osteomielite N (%)	1 (4,2)	3 (7,3)	-	-	-	-
ITU N(%)	1 (4,2)	2 (4,8)	2 (6,4)	1 (4,2)	-	-
Hepatomegalia N(%)	5 (21,7)	16 (39,0)	17 (54,8)	1 (50,0)	2 (33,0)	0,27
Esplenomegalia N(%)	2 (8,7)	5 (12,2)	6 (19,3)	1 (5,0)	1 (16,7)	0,48
Úlcera de perna N(%)	-	3 (7,3))	2 (6,4)	-	-	0,69
Seqüestro esplênico N(%)	1 (4,2)	3 (7,3)	2 (6,4)	-	1 (16,7)	0,69
HU N(%)	-	3 (7,3)	2 (6,4)	-	-	0,70

• teste do X^2

ITRS= Infecção do trato respiratório superior; ITU= Infecção do trato urinário; HU= hidroxiuréia

Na tabela 10 estão enumerados os dados relacionados à distribuição dos genótipos da globina β^S e os dados clínicos dos pacientes pertencentes ao grupo de PC. Os portadores do genótipo CAR/Bem 4/7 (57,1%) apresentaram frequência maior de pneumonia e broncopneumonia.

Tabela 10: Distribuição dos genótipos da globina β^S e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme internados em crise.

Genótipo N(%)	CAR / CAR 3(13,04)	CAR / Ben 7(30,43)	Ben / Ben 10(43,49)	Atípico 3(13,04)	p
Crise vaso- oclusivas N(%)	3(100)	7(100)	10(100)	3(100)	-
Transfusão N(%)	2(66,7)	6(85,7)	5(50)	3(100)	**0,275
ITRS N(%)	-	1(14,3)	-	-	**0,347
Pneumonia e broncopneumonia N(%)	1(33,3)	4(57,1)	-	-	**0,017
Osteomielite N (%)	-	-	-	-	-
ITU N(%)	-	2(28,6)	-	-	*0,120
Hepatomegalia N(%)	1(33,3)	6(85,7)	5(50)	3(100)	**0,256
Esplenomegalia N(%)	-	1(14,3)	3(30)	-	**0,199
Seqüestro esplênico N(%)	-	1(14,3)	1(10)	-	**0,523

* testes Kendall`s tau_b e Spearman`s rho

** Teste exato de Fisher ITRS= Infecção do trato respiratório superior; ITU= Infecção do trato urinário;

A talassemia $\alpha_2^{3.7Kb}$ foi investigada em 56 e 18 pacientes dos grupos PE e PC, respectivamente. No grupo de PE o genótipo selvagem foi encontrado em 46 pacientes

(82,1%), o mutante foi encontrado em homozigose em 3 (5,4%) indivíduos e em heterozigose em 7 (12,5%). Na tabela 11 estão enumerados os resultados da análise entre a presença da talassemia $\alpha_2^{3.7Kb}$, dados hematológicos e fenotípicos nos pacientes em estado estável.

Tabela 11. Distribuição da talassemia $\alpha_2^{3.7 Kb}$ e sua associação com aspectos hematológicos e fenotípicos em pacientes com anemia falciforme em estado estável.

Talassemia $\alpha_2^{3.7 Kb}$	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	Valor de p
Frequência N(%)	46(82,1)	3(5,4)	7(12,5)	-
HbF Média (\pm SD)	9,9 \pm 4,8	10,5 \pm 6,2	10,9 \pm 8,5	**0,862
Hb Média (\pm SD)	22,4 \pm 4,9	24,5 \pm 3,1	23,9 \pm 2,9	**0,549
Ht Média (\pm SD)	22,4 \pm 4,9	24,5 \pm 3,1	23,9 \pm 2,9	**0,565
VCM Média (\pm SD)	85,7 \pm 9,6	80,4 \pm 2,5	71,6 \pm 33,8	**0,294
HCM Média (\pm SD)	28,9 \pm 3,7	26,0 \pm 0,0	23,0 \pm 2,8	**0,129
Infecção N(%)	27(55,1)	2(40)	4(50)	*0,799
Internação N(%)	38(77,6)	2(40)	4(57,1)	*0,135
Seqüestro esplênico N(%)	2(4,1)	-	1(12,5)	*0,518
Pneumonia N(%)	2(7,7)	-	-	*0,267

* testes Kendall's tau_b e Spearman's rho ** ANOVA confirmada pelo pós-teste de Bonferroni

AVC=acidente vascular cerebral

A análise multivariada revelou relação estatisticamente significativa entre a contagem de leucócitos e a talassemia α (p=0,0000; F=32,8).

Na tabela 12 estão enumerados os resultados da análise entre a presença da talassemia $\alpha_2^{3.7Kb}$ e dados hematológicos e fenóticos em pacientes com anemia falciforme internados em crise.

Tabela 12. Distribuição da talassemia $\alpha_2^{3.7 Kb}$ e sua associação com aspectos hematológicos e fenóticos em pacientes com anemia falciforme internados por crise.

Talassemia $\alpha_2^{3.7 Kb}$	Selvagem	Homozigoto	*Valor de p
Frequência N(%)	16(88,9)	2(11,1)	
HbF Média (\pm SD)	8,4 \pm 5,7	5,4 \pm 5,9	* 0,960
Hb Média (\pm SD)	7,3 \pm 1,2	8,6 \pm 0,7	*0,121
Ht Média (\pm SD)	22,8 \pm 3,4	27,4 \pm 1,4	* 0,049
Infecção N(%)	12(66,7)	2(11,1)	**0,594
Internação N(%)	16(88,9)	2(11,1)	-
Seqüestro esplênico N(%)	-	1(50)	**0,111
Pneumonia N(%)	4(100)	-	**0,495

* Kruskal-Wallis **Teste exato de Fisher

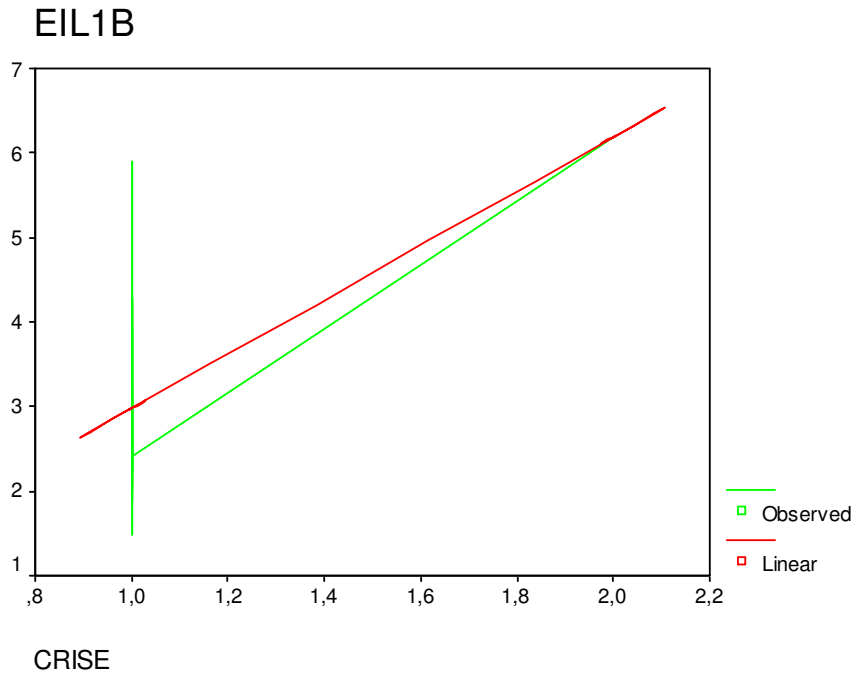


Figura 5. Análise de regressão linear entre os níveis de IL-1 β e a ocorrência de crises vaso-oclusivos no grupo de pacientes estáveis ($p=0,008$; $F=8,74$).

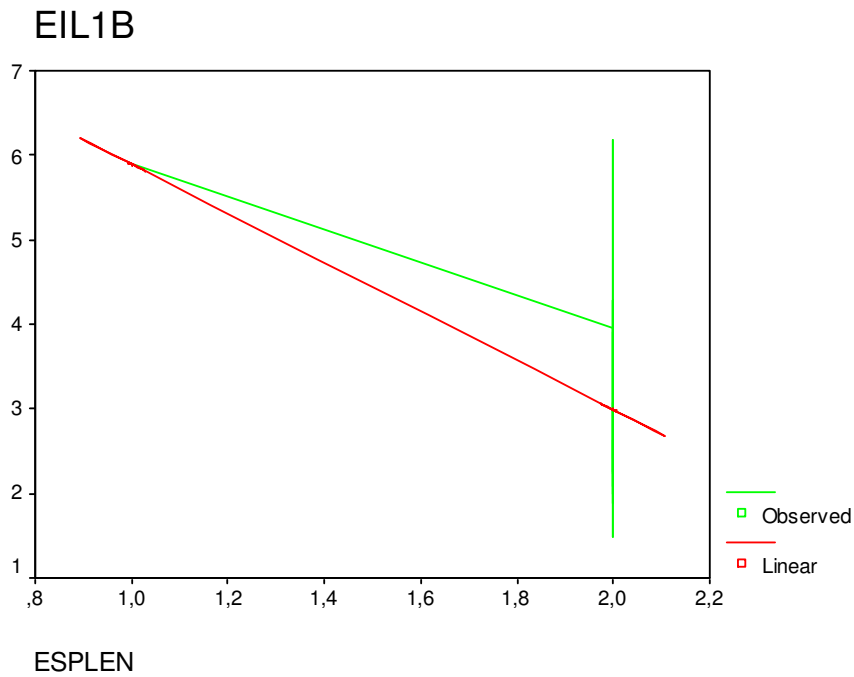
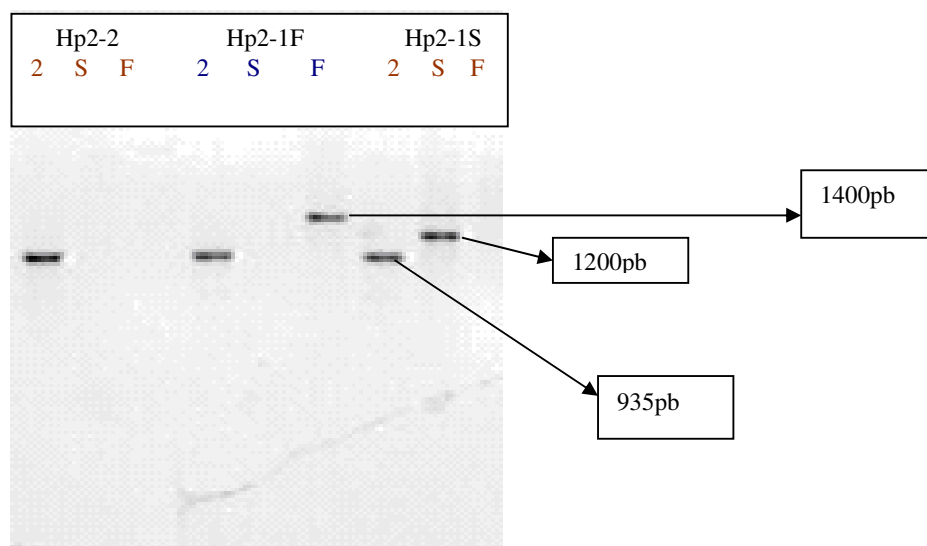


Figura 6. Análise de regressão linear entre os níveis de IL-1 β e a ocorrência de esplenomegalia no grupo de pacientes estáveis ($p=0,018$; $F=6,61$).

As citocinas TNF α e IL-6 não apresentaram valores estatisticamente significantes em relação aos dados clínicos, quando analisados os pacientes dos grupos PE e PC. Entretanto, os níveis da citocina IL-1 β foram estatisticamente significantes em duas variáveis, a frequência de crises vaso-oclusivos e esplenomegalia, na análise da regressão linear do grupo PE. A relação dos níveis de IL-1 β e a frequência de crises vaso-oclusivas são diretamente proporcionais (Figura 5), desta forma quanto maior o nível desta citocina maior a o relato de ocorrência destes eventos, sendo inversamente proporcional no caso da esplenomegalia (Figura 6).

6.2 POLIMORFISMOS DA HAPTOGLOBINA

A Figura 7A e 7B representa as corridas eletroforéticas em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR para investigação do polimorfismo da *HAPTOGLOBINA*, com dois produtos para os alelos *1S* (1200pb), *1F*(1400pb) e *2*(935pb), essenciais para definir os seis genótipos conhecidos como: Hp2-2, Hp2-1F, Hp2-1S, Hp1S-1S, Hp1S-1F e Hp1F-1F.



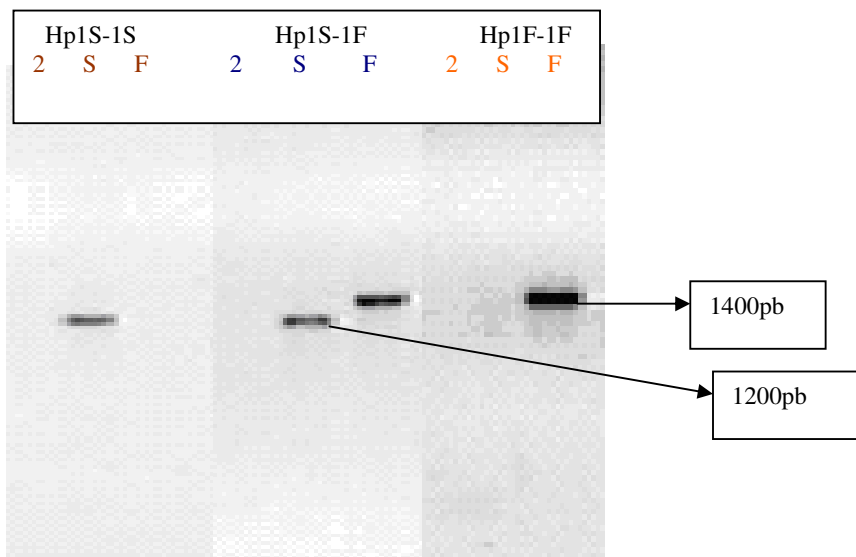


Figura 7A e B. Eletroforese em gel de agarose a 1%, demonstrando os padrões de bandas apresentados nos diferentes genótipos da haptoglobina (Hp) (YANO et al., 1998); pb= pares de bases

As frequências genóticas para os polimorfismos no gene da *HAPTOGLOBINA* entre portadores de anemia falciforme e no grupo de referência encontram-se enumeradas na tabela 13.

As frequências genóticas dos polimorfismos da *HP* entre os grupos PE e controle apresentaram diferenças estatisticamente significantes para os genótipos Hp1S-1F e Hp2-2 e entre os grupos PC e grupo de referência para os genótipos Hp2-1F e Hp2-2. As frequências alélicas foram estatisticamente significantes nos grupos PE e PC em relação ao grupo de referência, sendo que OR do alelo 2 apresentou menor que os demais alelos.

Na tabela 15 que nos grupos de pacientes com anemia falciforme, PE e PC, que as frequências observadas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém o grupo de referência não se apresentou em equilíbrio.

Tabela 13. Frequências dos alelos e genótipos da haptoglobina dos pacientes estáveis e internados em crise, portadores de anemia falciforme, em relação ao grupo de referência.

Alelos	Grupo de referência			p	Grupo de referência			p
	Estáveis		OR		Internados		OR	
1S			1,98				2,22	
N(%)	46(24)	47(13,7)	0,01<OR<3,19	*0,0041	12(26)	47(13,7)	1,00<OR<4,06	*0,0487
1F			2,56				2,89	
N(%)	54(28,1)	45(13,2)	1,61<OR<4,09	*0,0000	14(30,4)	45(13,2)	1,35<OR<66,13	*0,0044
2			0,34				0,28	
N(%)	92(47,9)	250(73,1)	0,23<OR<0,50	*0,0000	20(43,5)	250(73,1)	0,14<OR<0,56	*0,0000
Genótipos	Grupo de referência			p	Grupo de referência			p
	Estáveis		OR		Internados		OR	
Hp1S-1S			1,77				2,42	
N(%)	9(9.4)	10(5.8)	0,63<OR<4,93	*0,338	3(13.0)	10(5.8)	0,48<OR<10,74	**0,1881
Hp1S-1F			5,96				3,98	
N(%)	12(12.5)	4(2.3)	1,72<OR<22,68	*0,0020	2(8.7)	4(2.3)	0,47<OR<27,10	**0,1501
Hp1F-1F			2,26				1,73	
N(%)	14(14.6)	12(7.0)	0,93<OR<5,50	*0,0741	3(13.0)	12(7.0)	0,36<OR<7,33	**0,3150
Hp2-1S			1,29				1,35	
N(%)	16(16.7)	23(13.5)	0,61<OR<2,71	*0,5936	4(17.4)	23(13.5)	0,35<OR<4,76	**0,4015
Hp2-1F			1,55				3,2	
N(%)	14(14.6)	17(9.9)	0,68<OR<3,50	*0,3487	6(26.1)	17(9.9)	0,97<OR<10,2	*0,0366
Hp2-2			0,3				0,17	
N(%)	31(32.3)	105(61.4)	0,17<OR<0,52	*0,0000	5(21.7)	105(61.4)	0,05<OR<0,53	*0,0007

* χ^2 corrigido pelo Yates ** Teste de Fischer

Tabela 14. Frequências dos genótipos agrupados de acordo os alelos da haptoglobina dos pacientes estáveis e internados em crise em relação ao grupo de referência.

Alelos	Genótipos	Grupo de referência			OR	p	Grupo de referência		
		Estável	OR	p			Internados	OR	p
1S N(%)	Hp1S-1S								
	Hp1S-1F Hp2-1S	37(21,6)	37(38,5)	2,27 1,27<OR<4,08	*0,0048	37(21,6)	9(39,1)	2,33 0,85<OR<6,3	*0,1116
1F N(%)	Hp1F-1F								
	Hp1S-1F Hp2-1F	33(19,3)	40(41,7)	2,99 1,65<OR<5,41	*0,0001	33(19,3)	11(47,8)	3,83 1,42<OR<10,3	*0,0050
2 N(%)	Hp2-2								
	Hp2-1S Hp2-1F	145(84,8)	61(63,5)	0,31 0,17<OR<0,59	*0,0001	145(84,8)	15(65,2)	0,34 0,12<OR<0,97	*0,0427

* χ^2 corrigido pelo Yates

Tabela 15. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas da haptoglobina nos grupos de pacientes com anemia falciforme em estado estável e internados, e no grupo de referência.

HP	Frequência genotípica			Equilíbrio de Hard-Weinberg		
	Hp1S-S	Hp2-1S	Hp2-2		Hp1S	Hp2
				Obs	0,24	0,76
PE	9,0 (9,4)	16,0 (16,7)	31,0 (32,3)	Esp	0,401	0,599
				χ^2	0,97	
				p	0,3239	
GR	10 (5,8)	23 (13,5)	105 (61,4)	Obs	0,058	0,942
				Esp	0,269	0,731
				χ^2	9,72	
				p	0,0018	
				Obs	0,13	0,87
PC	3 (13)	4 (17,4)	5 (21,7)	Esp	0,5	0,5
				χ^2	0,44	
				p	0,5076	

HP	Frequência genotípica			Equilíbrio de Hard-Weinberg		
	Hp1F-1F	Hp2-1F	Hp2-2		Hp1F	Hp2
				Obs	0,146	0,854
PE	14(14,6)	14(14,6)	31(32,3)	Esp	0,487	0,513
				χ^2	2,98	
				p	0,0841	
				Obs	0,07	0,93
GR	12(7)	17(9,9)	105(61,4)	Esp	0,459	0,541
				χ^2	40,23	
				p	< 0,0000	
				Obs	0,13	0,87
PC	3(13)	6(26,1)	5(21,7)	Esp	0,463	0,537
				χ^2	0,02	
				p	0,8746	

HP	Frequência genotípica			Equilíbrio de Hard-Weinberg		
	Hp1S-1S	Hp1S-1F	Hp1F-1F		Hp1S	Hp1F
				Obs	0,094	0,906
PE	9,0 (9,4)	12(12,5)	14(14,6)	Esp	0,507	0,493
				χ^2	0,13	
				p	0,7204	
				Obs	0,058	0,942
GR	10(5,8)	2(8,7)	12(7)	Esp	0,62	0,38
				χ^2	1,07	
				p	0,3	
				Obs	0,013	0,987
PC	3(13)	4(2,3)	3(13)	Esp	0,612	0,388
				χ^2	0,51	
				p	0,4769	

Obs: Frequência Observada; Esp: Frequência esperada.
 PE=Pacientes estáveis; PC= Pacientes em crise; GR=Grupo de referência.

Na tabela 16 estão enumerados os dados referentes à distribuição genotípica da Hp e os dados hematológicos nos pacientes do grupo estável, onde nenhuma variável foi

estatisticamente significante. As mesmas análises foram realizadas no grupo de pacientes internados em crise, sendo diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 16. Distribuição dos genótipos da Hp e dados hematológicos entre diferentes portadores de anemia falciforme em estado estável

	Genótipo da Hp						*p
	Hp1S1S	Hp1S1F	Hp1F1F	Hp21S	Hp21F	Hp22	
Frequência	9(9.4)	12(12.5)	14(14.6)	16(16.7)	14(14.6)	31(32.3)	
Hb g/dL	7.8 ± 1.2	10.1 ± 4.8	8.1 ± 1.3	6.9 ± 1.5	7.4 ± 0.8	9.8 ± 13.1	0,222
Ht %	19.8 ± 6.9	25.4 ± 4.5	24.3 ± 2.7	21.5 ± 3.6	22.5 ± 2.1	23.1 ± 3.5	0,137
VCM fl	85.2 ± 10.9	84.4 ± 8.2	76.7 ± 27.2	86.1 ± 8.9	81.1 ± 13.0	86.4 ± 7.4	0,967
HCM %	21 ± 0	28.0 ± 1.0	29.5 ± 5.2	27.3 ± 5.2	26.3 ± 4.4	28.2 ± 2.8	0,672
HbF pg	8.8 ± 2.9	13.1 ± 12.3	12.3 ± 8.7	9.3 ± 4.2	9.6 ± 5.7	8.8 ± 5.4	0,932
HbS %	86.2 ± 3.8	79.8 ± 13.2	75.9 ± 15.3	84.7 ± 5.1	82.1 ± 13.9	84.6 ± 11.9	0,231
Reticulócitos %	5.3 ± 4.7	8.6 ± 4.5	6.8 ± 6.8	8.5 ± 5.6	6.4 ± 2.7	4.3 ± 2.3	0,170
Leucócitos (X1000)	12.9 ± 3.5	13.5 ± 5.7	22.8 ± 4.2	17.4 ± 6.9	15.9 ± 4.7	12.6 ± 4.3	0,063

*Kruskal Wallis

Tabela 17. Distribuição dos genótipos da Hp e dados hematológicos entre diferentes portadores de anemia falciforme em crise.

	Genótipo da HP						*p
	Hp1S1S	Hp1S1F	Hp1F1F	Hp21S	Hp21F	Hp22	
Frequência N(%)	3(13)	2(8,7)	3(13)	4(17,4)	6(26,1)	5(21,7)	
Hb g/dL	8,6±1,3	5,6±1,1	7,4±1,6	7,4±1,6	6,8±0,6	7,6±0,5	0,177
Ht %	26,3±3,1	19,2±4,6	22,9±4,4	23,0±4,8	21,6±2,4	24,0±1,9	0,307
VCM fl	92,5±0,0	86,0±0,0	-	-	87,4±6,4	82,4±7,6	0,364
HCM %	28,5±0,0	-	-	-	26,5±2,6	28,4±1,9	0,538
HbF pg	12,4±4,2	12,4±10,5	5,8±2,1	8,9±9,3	6,9±3,5	9,5±5,1	0,624
HbS %	83,6±4,3	67,6±5,6	66,7±19,1	63,4±8,4	73,3±23,1	86,6±4,6	0,290
Reticulócitos %	7,2±3,4	14,9±6,6	8,9±2,5	8,1±3,9	9,9±4,4	7,2±5,8	0,661
Leucócitos (X1000)	26,8±5,2	28,4±13,1	16,5±7,2	20,4±6,8	22,1±4,6	28,6±12,5	0,462

*Kruskal Wallis

Nas tabelas 18 e 19 estão enumerados os dados referentes à associação entre os genótipos da Hp e as comorbidades clínicas em portadores de anemia falciforme em estado estável e crise, respectivamente. A análise em ambos os grupos de pacientes não demonstrou dados estatisticamente significante. Na análise multivariada foram descritos valores estatisticamente significantes entre os genótipos da haptoglobina e contagem de leucócitos ($p=0,000$; $F=16,2$) e a crises vaso-oclusivos ($p=0,010$; $F=4,07$).

Tabela 18. Distribuição dos genótipos da Hp e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme em estado estável.

	Genótipo da Hp					
	Hp1S1S N(%)	Hp1S1F N(%)	Hp1F1F N(%)	Hp21S N(%)	Hp21F N(%)	Hp22 N(%)
Infecção	2(4,3)	6(12,8)	7(14,9)	9(19,1)	7(14,9)	16(34,0)
Crise vaso-occlusivos N(%)	6(7,3)	12(14,6)	11(13,4)	14(17,1)	13(15,8)	26(31,7)
Sequestro esplênico	-	1(14,3)	1(14,3)	3(42,9)	1(14,3)	1(14,3)
AVC	-	-	2(50)	1(25)	-	1(25)
Úlcera	-	1(20)	1(20)	-	1(20)	2(40)
Esplenomegalia	1(7,1)	1(7,1)	2(14,3)	4(28,6)	4(28,6)	2(14,3)
Crise	6(7,2)	12(14,4)	11(13,2)	15(18,1)	13(15,7)	26(31,3)
Hidroxiuréia	-	-	3(60)	-	-	2(40)

AVC=acidente vascular cerebral

Tabela 19. Distribuição dos genótipos da Hp e história clínica das comorbidades apresentadas pelos portadores de anemia falciforme internados.

	Genótipo da Hp					
	Hp1S1S N(%)	Hp1S1F N(%)	Hp1F1F N(%)	Hp21S N(%)	Hp21F N(%)	Hp22 N(%)
Infecção	1(5,6)	2(11,2)	3(16,7)	3(16,7)	5(27,8)	4(22,4)
Crise vaso-occlusivos N(%)	3(13)	2(8,7)	3(13)	4(17,4)	6(26,1)	5(21,7)
Média de eventos \pm SD	3,0 \pm 0,0	4,5 \pm 2,1	6,3 \pm 3,5	4,8 \pm 3,5	4,8 \pm 2,7	4,6 \pm 0,9
Sequestro esplênico	-	1(50)	-	1(50)	-	-
AVC	-	-	-	1(50)	-	1(50)
Esplenomegalia	-	2(50)	-	1(25)	-	1(25)
Crise	3(13,0)	2(8,7)	3(13,0)	4(17,4)	6(26,1)	5(21,7)
Hidroxiuréia	-	-	-	-	-	-

AVC=acidente vascular cerebral

Tabela 20. Genótipos da Hp e história clínica das infecções apresentadas pelos portadores de anemia falciforme em estado estável e internados em crise.

	Genótipo da Hp					
	Hp1S1S N(%)	Hp1S1F N(%)	Hp1F1F N(%)	Hp21S N(%)	Hp21F N(%)	Hp22 N(%)
Infecção	3(4.7)	8(12.5)	10(15.6)	12(18.8)	12(18.8)	20(31.2)
ITR (PE)	-	1(1.6)	1(1.6)	3(4.7)	1(1.6)	5(7.8)
ITR (PC)	1(1.6)	-	-	1(1.6)	-	-
ITU (PE)	-	-	-	1(1.6)	-	1(1.6)
ITU (PC)	-	1(1.6)	-	-	1(1.6)	-
Broncopneumonia(PE)	-	1(1.6)	1(1.6)	-	-	2(3.1)
Broncopneumonia(PC)	-	-	-	-	-	1(1.6)
Pneumonia (PE)	1(1.6)	-	-	2(3.1)	2(3.1)	2(3.1)
Pneumonia (PC)	-	-	1(1.6)	1(1.6)	3(4.7)	-
ITU + Pneumonia(PE)	-	-	-	-	-	-
ITU + Pneumonia(PC)	1(1.6)	-	1(1.6)	1(1.6)	1(1.6)	2(3.1)
OUTROS (PE +PC)	-	5(7.8)	6(9.4)	3(4.7)	4(6.2)	7(10.9)

ITRS= Infecção do trato respiratório superior; ITU= Infecção do trato urinário; PE=paciente estável; PC=paciente em crise.

Os dados relativos à distribuição dos genótipos da Hp e sua associação com a talassemia α 2^{3.7 Kb} em pacientes estáveis e em crise estão enumerados na tabela 20, sendo que o estudo da talassemia α 2^{3.7 Kb} foi realizado em 85 dos 141 pacientes com anemia falciforme. Na análise multivariada foram encontrados valores estatisticamente significantes para a relação entre os genótipos da Hp e talassemia α 2^{3.7 Kb} com a contagem de leucócitos (p=0,000; F=44,4) e crises vaso-oclusivas (p=0,006; F=6,57).

Tabela 21. Distribuição dos genótipos da Hp e sua associação com a talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ em pacientes estáveis e internados.

Talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ (genótipo)	Genótipo da Hp					
	Hp1S1S N (%)	Hp1S1F N (%)	Hp1F1F N (%)	Hp21S N (%)	Hp21F N (%)	Hp22 N (%)
Selvagem (PE)	6(10,7)	5(8,9)	4(7,1)	8(13,8)	7(12,5)	14(25)
Selvagem (PC)	3(18,8)	1(6,2)	3(18,8)	3(18,8)	4(25)	2 (12,5)
Heterozigoto (PE)	-	-	2(3,6)	1(1,8)	2(3,6)	5(8,9)
Heterozigoto (PC)	-	-	-	-	-	-
Homozigoto (PE)	1(1,8)	-	3(5,4)	-	3(5,4)	7(12,5)
Homozigoto (PC)	-	-	-	1(50)	-	1(50)

A associação entre os genótipos da Hp e os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em pacientes estáveis e internados em crise está representada na tabela 21 demonstrando associação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na dosagem da IL-6 desses pacientes, onde o genótipo Hp1S-1S nos pacientes em crise apresentou níveis mais elevados dessa citocina e o genótipo Hp2-1S no grupo de indivíduos estáveis em relação aos demais genótipos da Hp.

Tabela 22. Associação entre os genótipos da Hp e os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em pacientes estáveis e em crise.

Citocinas	Genótipo da Hp						p
	Hp1S1S	Hp1S1F	Hp1F1F	Hp21S	Hp21F	Hp22	
TNF α (PE)	2,5 \pm 0,01	2,0 \pm 0,7	2,8 \pm 0,6	2,7 \pm 1,1	2,3 \pm 0,9	1,1 \pm 0,8	*0,137
TNF α (PC)	10,1 \pm 14,5	10,4 \pm 12,6	5,6 \pm 4,7	5,6 \pm 5,6	6,2 \pm 6,2	9,2 \pm 8,1	*0,991
IL-1 β (PE)	2,1 \pm 0,2	3,5 \pm 0,7	4,6 \pm 2,3	3,4 \pm 1,7	2,6 \pm 1,1	1,9 \pm 0,0	*0,133
IL-1 β (PC)	2,4 \pm 0,5	2,4 \pm 0,2	12,3 \pm 18,7	1,9 \pm 0,5	6,7 \pm 5,9	2,9 \pm 0,9	*0,754
IL-6 (PE)	-	9,2 \pm 2,8	8,4 \pm 3,2	13,2 \pm 9,2	6,9 \pm 2,9	4,5 \pm 1,8	*0,0454
IL-6 (PC)	62,4 \pm 2,6	24,8 \pm 0,0	8,4 \pm 0,0	32,0 \pm 4,5	11,4 \pm 0,0	-	**0,018

*Kruskal Wallis ** ANOVA confirmada pelo pós-teste de Bonferroni

A análise multivariada dos genótipos da Hp e IL-6 foram estatisticamente significantes, confirmando o resultado apresentado na tabela acima.

DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma doença genética e hematológica, cujos portadores apresentam uma variedade ampla de manifestações clínicas, como trombose, crises dolorosas, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA), priapismo, retinopatia, úlcera de perna e crise de hemólise aguda, entre outras (BALLAS, 1996). No presente trabalho, o grupo de pacientes internados teve como principal causa de internação a crise vaso-oclusiva, associada ou não a infecção, seguida de hepatomegalia. Além disso, observou-se um número elevado de eventos de vaso-oclusão quando avaliados os históricos clínicos dos pacientes em estado estável em acompanhamento ambulatorial, sendo que também apresentaram frequência elevada de hepatomegalia, icterícia, esplenomegalia, seqüestro esplênico e convulsão. Esses resultados demonstram a heterogeneidade fenotípica apresentada pelos pacientes com anemia falciforme, corroborando com outros estudos que descrevem a variedade das manifestações clínicas entre diferentes indivíduos (MAKIS *et al*, 2000; REDDING-LALLINGER & KNOLL, 2006).

Vários estudos indicam a vaso-oclusão em pequenos vasos como a origem fisiopatológica principal dos sintomas clínicos presentes na anemia falciforme, sendo que nesse fenômeno a obstrução dos vasos sanguíneos ocorre devido à interação entre as hemácias, leucócitos, plaquetas, moléculas de adesão e endotélio vascular, sendo preferencialmente nas veias pós-capilares, e apresentando o aumento da secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) por monócitos, células endoteliais, leucócitos, dentre outras células, estimulando tanto o recrutamento de leucócitos, quanto a ativação endotelial (STEINBERG, 2001; OKPALA, 2004).

Os resultados obtidos apontaram para um número menor de episódios infecciosos entre os pacientes em acompanhamento ambulatorial (PE) quando comparados aos pacientes internados em crise (PC), provavelmente em decorrência do

acompanhamento médico contínuo e de estarem utilizando medicamentos profiláticos, tais como uso de antibióticos, ter obedecido ao calendário de vacinação e, mais recentemente, estar em uso de hidroxiuréia (HU) e de terapia poli-transfusional (QUINN *et al.*, 2004). No grupo PC, as causas principais de hospitalização foram a vaso-oclusão associada à infecção (60,9%), a vaso-oclusão (26,0%) e a infecção (13,0%). No estudo realizado, em Salvador e São Paulo, em pacientes pediátricos hospitalizados, a causa principal de internação hospitalar foi a vaso-oclusão nas duas populações (LYRA *et al.*, 2005). O estado inflamatório crônico intenso na anemia falciforme e a imunidade individual, provavelmente influenciam a ocorrência de infecções, apesar de não estar definido o mecanismo e os componentes do sistema imune que estão envolvidos na susceptibilidade elevada a infecções recorrentes apresentada pelos portadores de anemia falciforme (WAGENER *et al.*, 1997).

Os dados hematológicos, quando foram comparados os dois grupos de pacientes, demonstraram que a concentração de hemoglobina fetal foi maior nos pacientes estáveis (PE) do que nos internados em crise (PC), enquanto que as contagens de reticulócitos e leucócitos apresentaram-se elevadas no grupo PC em relação ao grupo PE. Os mesmos resultados foram obtidos quando analisados os pacientes pediátricos desses grupos. Os níveis elevados de HbF têm sido correlacionados a uma clínica mais branda nos pacientes com anemia falciforme (STEINBERG, 1995). Os dados demonstram aumento no número de leucócitos, sendo que o grupo PC apresentou valores mais elevados que o grupo PE, corroborando com estudos prévios que associaram a leucocitose como fator de risco para a ocorrência de AVC e síndrome torácica aguda, bem como a morbimortalidade elevada apresentada pelos pacientes (CASTRO *et al.*, 1994). A participação dos leucócitos na vaso-oclusão inicia-se a partir do processo de rolamento e expressão de integrinas, que promovem o aumento da adesão ao endotélio vascular.

Após a adesão ao endotélio vascular, as hemácias diminuem o fluxo sanguíneo e facilitam a ligação de mais hemácias falciformes, iniciando a obstrução vascular, fato que explica a frequência elevada de episódios de vaso-oclusão e sua associação ao número elevado de leucócitos entre os pacientes internados (CANALLI *et al.*, 2004; OKPALA, 2004).

Os dados descritos no presente estudo relacionados aos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S demonstraram frequência elevada do genótipo CAR/Ben, seguida pelo Ben/Ben e CAR/CAR, com número reduzido dos genótipos CAR/Cam e atípico, no grupo PE e PC, sendo que os pacientes do grupo PC não apresentaram o genótipo CAR/Cam e o genótipo CAR/CAR apresentou frequência mais elevada no grupo PE que no grupo PC. Esses resultados corroboram com os estudos realizados por Adorno *et al.* (2004) e Gonçalves *et al.* (2003), que descreveram frequências semelhantes ao estudarem a mesma população.

No presente estudo, os níveis elevados de HbF não estiveram associados ao haplótipo da globina β^S nos pacientes em estado estável, apesar dos genótipos Ben/Ben e o CAR/Ben terem sido mais frequentes no grupo PC, onde a análise dos dados não demonstrou diferenças significantes entre os níveis de HbF e a presença de haplótipos específicos. Os dados apresentados possuem diferenças quando comparados a estudos previamente realizados e que apresentam abordagens semelhantes (POWARS, 1991; STEINBERG, 1995; GONÇALVES *et al.*, 2003). As análises associadas aos índices hematológicos demonstraram que os valores de volume corpuscular médio (VCM) apresentaram diferenças entre os diversos haplótipos associados aos genes da globina β^S no grupo PE, sendo que os pacientes portadores do genótipo CAR/Ben apresentaram concentrações diminuídas de VCM quando comparados aos outros genótipos, podendo

estar relacionados à diminuição do grau de hemólise nesses indivíduos, dados primeiramente descritos por NAGEL & STEINBERG (2001).

Os dados obtidos e referentes aos haplótipos ligados aos genes da globina β^S e aspectos clínicos apresentados pelos pacientes demonstram que no grupo PE os episódios de vaso-oclusão foram os eventos clínicos mais frequentes ($p < 0,05$), sendo que os genótipos CAR/Cam seguido pelo Ben/Ben e o atípico foram aqueles que apresentaram média mais elevada de eventos em comparação com os demais genótipos. No grupo PC todos os pacientes apresentavam crise vaso-oclusiva, sendo que o genótipo com média maior de eventos foi o CAR/Ben e a menor foi o CAR/CAR em comparação aos demais genótipos. A frequência de infecções associada à pneumonia e broncopneumonia foi mais elevada no genótipo Ben/Ben ($p < 0,05$), onde 57,1% dos indivíduos desenvolveram essas infecções. O haplótipo CAR tem sido associado à gravidade clínica na anemia falciforme (POWARS, 1991). No trabalho realizado por Lyra *et al.* (2005) foi observada frequência elevada de internações por crise vaso-oclusiva ou por infecções em portadores do genótipo CAR/Ben, sendo seguida pelos portadores do genótipo CAR/CAR. Apesar dos dados presentes na literatura estarem relacionando à gravidade clínica de pacientes com o haplótipos CAR, os resultados deste estudo indicam que esta variável, quando analisada isoladamente não parece estar associada diretamente à gravidade da doença, necessitando estudos adicionais com um número maior de indivíduos CAR/CAR, visando o esclarecimento desse achado.

A talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ foi descrita na frequência de 13,1% no grupo PE e de 11,1% no grupo PC. Apesar da talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ estar associada a níveis elevados de HbF, neste trabalho esta análise não foi estatisticamente significativa. Entretanto, a talassemia foi associada a concentrações diminuídas de VCM ($p < 0,05$) e a concentrações elevadas hemoglobina e hematócrito no grupo PC. O trabalho realizado

por Adorno *et al.* (2005), também apresenta resultados correlacionando concentrações diminuídas de VCM e elevadas de Hb e Ht em indivíduos com anemia falciforme de Salvador, na presença de talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$.

Os pacientes com anemia falciforme estão em constante estado inflamatório, com níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 que apresentam secreção aumentada durante as crises vaso-oclusivos (MICHAELS *et al.*, 1998). O presente estudo confirmou esses dados, onde os níveis séricos dessas citocinas apresentaram-se mais elevados no grupo PC que no grupo PE. Pathare *et al.* (2004) realizaram um estudo em Oman, descrevendo valores estatisticamente significativos para as concentrações séricas das citocinas TNF- α e IL-6 em portadores de anemia falciforme, quando compararam pacientes em estado estável e em crise vaso-oclusivo, sendo que o grupo em crise apresentou valores maiores dessas citocinas.

Em relação aos níveis séricos das citocinas e os dados clínicos somente a IL1- β apresentou valores estatisticamente significante para a frequência de crises vaso-oclusivo na regressão linear, confirmando os dados de participação da IL1- β , uma citocina pró-inflamatória, nas crises vaso-oclusivos (MICHAELS *et al.*, 1998). Entretanto, resultados semelhantes não foram obtidos na análise de regressão linear da citocina IL-1 β e esplenomegalia, onde níveis séricos mais elevados de IL-1 β estão relacionados com menor número de esplenomegalia. Essa ocorrência pode estar associada à presença de pacientes em idade superior a 5 anos, faixa etária frequentemente relacionada a diminuição desses episódios devido auto-esplenectomia (STEINBERG, 2001).

O prognóstico clínico da anemia falciforme pode ser influenciado por diversos fatores que determinam à heterogeneidade presente na doença. Dessa forma, os fatores

prognósticos devem ser considerados conjuntamente, de maneira que possam ser obtidos resultados relacionados ao prognóstico da doença, visando associá-los as condições ambientais e sociais apresentadas por esses indivíduos. Vários estudos têm sido realizados no sentido de encontrar genes candidatos que podem influenciar no fenótipo da anemia falciforme (STEINBERG, 1995; SULLIVAN *et al.*, 2001; HOPPE *et al.*, 2004).

O presente trabalho investigou uma provável relação entre polimorfismos nos genes da haptoglobina e a anemia falciforme, visando o encontro de um possível candidato a marcador no processo de vaso-oclusão e resposta imune. Isso se deve ao fato de que a haptoglobina tem um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo, principalmente em patologias que envolvem hemólise intravascular, como é o caso da anemia falciforme, uma vez que esta se liga a hemoglobina, evitando que ela se degrade em heme livre no plasma com liberação de ferro, que é um agente oxidante extremamente potente (BALLA *et al.*, 1991).

Vários estudos têm relacionado polimorfismos da haptoglobina a patologias, como doenças hematológicas, neurológicas, cardíacas, diabetes mellitus, neoplasias malignas e infecções (exemplo HIV) (SADRZADEH *et al.*, 2004). O estudo da frequência realizada em diferentes genótipos da Hp (Hp1S-1S, Hp1S-1F, Hp1F-1F, Hp2-1S, Hp2-1F e Hp2-2) nos três grupos estudados, o grupo PE, o grupo PC e o grupo de referência, os genótipos Hp1S-1F e o Hp1F-1F apresentaram a maior frequência ($p < 0,05$) no grupo PE e o genótipo Hp2-2 apresentou maior frequência ($p < 0,05$) no grupo PC, sugerindo que os indivíduos que possuem o genótipo Hp2-2 possuem uma menor proteção aos efeitos do estresse oxidativo, o que vai gerar uma maior susceptibilidade a ocorrência de crises vaso-oclusivas, em oposição aos indivíduos portadores dos genótipos Hp1S-1F e o Hp1F-1F (efeito antioxidante).

Vários estudos demonstram que a frequência dos alelos da *Hp* pode variar de acordo com a localização geográfica da população em estudo, sendo que o sudeste da Ásia apresenta frequência diminuída do alelo *Hp1* (0,10) em relação à população indígena da América do Sul (0,80) (LANGLOIS *et al.*, 1996). A distribuição do fenótipo da haptoglobina na população européia é de aproximadamente 15% para os indivíduos *Hp 1-1*; 50% para os *Hp2-1* e 35% para os *Hp2-2*, o que equivale a uma frequência de aproximadamente 0,40 para o alelo *Hp1* (LOUAGIE., *et al.*, 1996). Ostrowski *et al.*, (1987) descreveram que o alelo *Hp1* estava mais presente na população negra com anemia falciforme. Entretanto, estudos realizados no sul e sudeste do Brasil não acharam significância estatística na frequência dos diferentes genótipos da haptoglobina, tanto em indivíduos negros como em caucasóides, sendo o genótipo *Hp1-1* o mais freqüente (MOREIRA *et al.*, 1990).

No presente estudo as distribuições das frequências alélicas e genóticas da haptoglobina entre os grupos de pacientes com anemia falciforme em estado estável e internados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém o grupo referência não apresenta este equilíbrio. As diferenças atribuídas a este evento podem estar associadas à origem afro-descendente dos pacientes bem como a mistura racial que compõe o grupo referência (índios, negros e caucasóides de origem européia), reforçando os dados já apresentados por AZEVEDO *et al.*, (1980).

No presente estudo a análise da distribuição do genótipo da *Hp* e dados hematológicos nos pacientes com anemia falciforme do grupo PE e PC não apresentaram significância estatística. Entretanto, o número de leucócitos do genótipo *Hp2-2* foi mais elevado que os demais genótipos, apresentando valores estaticamente significantes na análise multivariada dos genótipos da *Hp* apresentou valores. A leucocitose tem sido relacionada ao aumento do risco de hemólise, morbimortalidade

em indivíduos com síndrome torácica aguda e de AVC em pacientes com anemia falciforme. Langlois *et al* (2000), em trabalho realizado na Bélgica em 717 caucasianos saudáveis encontraram valores estatisticamente significante para os níveis de Hp e seus diferentes genótipos.

A frequência elevada de infecção descrita neste estudo em portadores do genótipo Hp2-2 no grupo PE e o genótipo Hp2-1F no grupo PC, sendo que, o genótipo Hp1S-1S apresentou frequência diminuída nos dois grupos. Na avaliação das crises vaso-oclusivos do grupo PE foi observado que o genótipo Hp2-2 teve número mais elevado de episódios do que o genótipo Hp1S-1S. A Hp então exerce papel importante ao se ligar a Hb evitando a formação de radicais livres, possuindo desta forma uma função de antioxidante.

Os fenótipos da Hp têm a mesma afinidade pela Hb livre no plasma, contudo ao complexo Hp2-2-Hb tem uma maior afinidade de ligação ao receptor na superfície dos macrófagos e monócitos, CD163, fato que ocorre devido Hp2-2 ser um polímero cíclico, com vários sítios de ligação quando comparado com os dímeros Hp1-1. Entretanto, a Hp1-1 tem maior capacidade de atravessar as barreiras para os espaços intracelulares do que o Hp2-2, principalmente devido ao seu tamanho (GRAVERSEN *et al.*, 2002). Os indivíduos Hp2-2 têm menor capacidade antioxidante em comparação aos indivíduos do fenótipo Hp1-1, que são dímeros com maior capacidade de prevenção ao dano causado pela Hb livre (LANGE, 1992).

Os dados encontrados neste trabalho demonstraram que o uso terapêutico de HU ainda não é amplamente utilizado na Bahia, sendo que no grupo PE, três entre os 14 indivíduos portadores do genótipo Hp1F-1F e dois entre os 31 do genótipo Hp2-2 estavam em uso de HU. A HU apresenta efeito na proliferação celular, diminuindo a expressão de moléculas de adesão, aumentando os níveis de HbF e, desta forma,

conduzindo a uma melhora do curso clínico da doença (CHARACHE *et al.*, 1995; SALEH *et al.*, 1999). Os pacientes em uso de HU foram selecionados de acordo com os critérios estabelecidos para o uso da terapia, que são baseados em concentrações diminuída de HbF, níveis elevados de HbS e número elevado de transfusões e eventos clínicos.

Os dados da distribuição dos genótipos da Hp e a associação com a talassemia α 2^{3.7 Kb} em pacientes estáveis foi significativo na análise multivariada, sendo a talassemia considerada um fator de bom prognóstico clínico em doenças hemolíticas. Os resultados obtidos confirmam os dados do estudo realizado por IMRIE *et al* (2006), na região da Papua em Nova Guiné, área endêmica para malária, que demonstraram efeito protetor da talassemia nos eventos de crises hemolíticas que ocorre nessa doença, enfatizando que os indivíduos homocigotos apresentam expressão elevada de IL-6, aumentando desta forma a síntese de haptoglobina.

A avaliação dos resultados relativos às citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e os genótipos da Hp demonstraram valores estatisticamente significantes para os níveis de IL-6. O genótipo com níveis médios mais elevados de IL-6 foi o genótipo Hp1S-1S no grupo PC e Hp2-1S no grupo PE. Os nossos dados sugerem que devido à hemólise intravascular, existe a liberação de hemoglobina que é rapidamente degradada em grupo heme. Esse processo gera a formação de radicais livres que levam ao estresse oxidativo e a vaso-occlusão. Com o aumento do heme há um consumo da Hp, o que leva à liberação da IL-6 produzida pelos macrófagos presentes na região onde está ocorrendo a vaso-occlusão, estimulando o fígado a produzir mais haptoglobina (JANEWAY *et al.*, 2001). Desta forma, os nossos resultados sugerem que indivíduos do genótipo Hp1S-1S apresentam níveis elevados de IL-6, levando a uma maior produção de

haptoglobina e maior capacidade antioxidante que o genótipo Hp2-2, fato que poderá estar contribuindo para diminuir a ocorrência das crises vaso-oclusivos.

CONCLUSÕES

- A avaliação dos dados hematológicos demonstrou que os pacientes com anemia falciforme, do grupo estável, apresentaram valores médios de VCM maiores no haplótipo Ben/Ben que nos demais haplótipos;
- Encontramos associação entre indivíduos que tiveram crises vaso-oclusivos e o haplótipo CAR/Ben em comparação aos demais haplótipos em paciente do grupo estáveis com anemia falciforme;
- As infecções por broncopneumonia e pneumonia foram mais freqüentes em pacientes internados por crise vaso-oclusivo portadores do haplótipo CAR/Ben;
- Os indivíduos homocigotos para talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$ apresentaram valores mais elevados de hematócrito, sendo então um fator prognóstico clínico favorável;
- A IL1- β apresentou valores estatisticamente significantes para a ocorrência de crises vaso-oclusivos, confirmando a participação de citocinas pró-inflamatórias nestes eventos;
- O grupo de pacientes em estado estável apresentou freqüências mais elevadas dos genótipos Hp1S-1F e Hp1F-1F que o grupo referência e os pacientes internados em crise apresentaram freqüência mais elevada dos genótipos Hp2-1F que o grupo referência;
- Os pacientes em crises portadores do genótipo Hp1S-1S apresentaram níveis mais elevados da IL-6; enquanto que os portadores do genótipo Hp2-1S foram

aqueles que apresentaram níveis mais elevados de IL-6 no grupo de paciente estável;

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO EV, ZANETTE A, LYRA I, SOUZA CC, SANTOS LF, MENEZES JF, DUPUIT MF, ALMEIDA MN, REIS MG, GONCALVES MS. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin**. v.28, p 267-71, 2004.

ADORNO, E.V.; COUTO, F.D.; MOURA NETO, J.P.; MENEZES, J.F.; REGO, M.; REIS, M.G; GONÇALVES, M.S. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**, n. 21, p. 292-298, 2005.

ATKINSON SH, ROCKETT K, SIRUGO G, BEJON PA, FULFORD A, O'CONNELL MA, BAILEY R, KWIATKOWSKI DP, PRENTICE AM. Seasonal childhood anaemia in West Africa is associated with the haptoglobin 2-2 genotype. **PLoS Med**. May;3(5):e172, 2006. Epub May 2, 2006.

ANTONARAKIS, S. E.; BOEHM, C. D.; SERJEANT, G. R.; THEISEN, C.E.; DOVER, G. J.; KAZAZIAN JUNIOR, H. H. Origin of the β^S -globin gene in blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc. Natl. Acad. Sci.**; v. 81, p. 853-856, 1984.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília (DF): Anvisa;.p10 – 11, 2002.

AZEVEDO, E.S.; ALVES, A.F.P.; SILVA, M.C.B.O.; SOUZA, M.G.F.; LIMA, A.M.V.M.D.; AZEVEDO, W.C. Distribution of abnormal hemoglobins and

glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. **53**, p. 509-512, 1980.

BALLA G, JACOB HS, EATON JW, BELCHER JD, VERCELLOTTI GM.
Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb.* v. 11. p.1700–1711,1991.

BALLAS SK, MOHANDAS N. Pathophysiology of vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am.** Dec;10(6):1221-39, 1996.

BIDWELL, J.L.; WOOD, N.A.P.; MORSE, H.R.; OLOMOLAIYE, O.O.; LAUNDY, G.J. Human Cytokine gene nucleotide sequence alignments. **Eur. J. Immunogenet.**, v. **25**, p.83-266, 1998.

BORISH LC, STEINKE JW. Cytokines and chemokines.. **J Allergy Clin Immunol.** Feb;111(2 Suppl):S460-75, 2003.

BOWMAN BH, KUROSKY A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. **Adv Hum Genet.**;12:189-261, 453-4, 1982.

BRANDELISE, S.; PINHEIRO, V.; GABETTA, C.S.; HAMBLETON, I.; SERJEANT, B.; SERJEANT, G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. **Clin. Lab. Haematol.**, v. **26**, p.15-19, 2004.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, PA.: Saunders, 1986.

BUNN, H.F. Sickle hemoglobin and other hemoglobin mutants. In: STAMATOYANNOPOULOS, G.; NIENHUIS, A.W., MAJERUS, P.W.; VARNUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, cap. 6, p. 207-256, 1994.

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

CAMEJO G, HALBERG C, MANSCHIK-LUNDIN A, HURT-CAMEJO E, ROSENGREN B, OLSSON H, HANSSON GI, FORSBERG GB, YLHEN B. Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human macrophages. **J. Lipid. Res.** V. 39. p.755-766,1998 .

CANALLI, A.A.; CONRAN, N.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Exp Hematol.** v.**32**, n. 8, p. 728-34, 2004.

CARPENTER, L.R.; YANCOPOULOS, G.D.; STAHL, N. General mechanisms of cytokine receptor signaling. **Adv Protein Chem.**, v. **52**, p. 109-140,1998.

CASTRO O, BRAMBILLA DJ, THORINGTON B, REINDORF CA, SCOTT RB, GILLETTE P, VERA JC, LEVY PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**. Jul 15; v. 84 p.643-9, 1994

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

CHARACHE, 1995 CHARACHE, S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D.; DOVER, G.J.; BARTON, F.B.; ECKERT, S.V.; MCMAHON, R.P.; BONDS, D.R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med.**, v. 332, n. 20, p.1317-22, 1995.

CONRAN, N.; FATTORI, A.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. **Am. J. Hematol.**, v. 76, p. 343-347, 2004.

COSTA, F.F. Anemia Falciforme. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R.. **Hematologia, Fundamentos e Prática**. 1 ed, São Paulo: Atheneu, cap. 7, p. 289-308, 2001.

COSTA, F.F. Anemia falciforme. In.: **Hematologia: fundamentos e prática**. ZAGO, A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. 1ed. São Paulo, Atheneu, cap30, p304-305, 2004.

COUTO, F.D.; DE ALBUQUERQUE, A.B.; ADORNO, E.V.; DE MOURA NETO, J.P.; DE FREITAS, A.L.; DE OLIVEIRA, J.L.; DOS REIS, M.G.; GONCALVES, M. Alpha-Thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. **Clin. Lab. Haematol.** v. **25**, p. 29-34, 2003.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 6.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984.

DELANGHE, J.R.; LANGLOIS, M.R.; BOELAERT, J.R.; VAN WANZEELE, F.; VAN DER GROEN, G. Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. **AIDS**, 12(9):1027-1132, 1998b.

DOBRYSZYCKA, W. Biological function of haptoglobin- new pieces to an old puzzle. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, 35(9):647-54, 1997.

EMBURY, S.H. Sickle cell disease. In: HOFFMAN, R.; BENZ JUNIOR, E. J.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E. **Hematology**. 2.ed. New York: Churdhill Livingstone. p. 611-640, 1995.

ERLICH, H.A. **PCR Techenology - priciples and aplications for DNA amplification**. New York: Stockton Press, 1989.

FABRY ME, KAUL DK. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am.** Jun;5(3):375-98, 1991.

FADLON E, VORDERMEIER S, PEARSON TC, MIRE-SLUIS AR, DUMONDE DC, PHILLIPS J, FISHLOCK K, BROWN KA.. Blood polimorphonuclear leukocytes from the majority of the sickle cell patients in the crisis phase of the diseases show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood.** V.91. p. 266-274, 1998.

FAIRBANKS, V.F. & KLEE, G.G. **Biochemical aspects of Hematology.** In: Tietz. N.W. Fundamentals of clinical chemistry. 3 ed. Philadephia:W.B Saunders Company. v. 2. Cap.24. p. 789-824, 1987.

FRANCIS RB JR, HAYWOOD LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. **J Natl Med Assoc.** v.84. P.611-615, 1992.

FRANK M. M., LACHE O., ENAV B. I., SZAFRANEK T, LEVY N. S., RICKLIS R. M., AND. LEVY A. P..Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin; **Blood.** v. 98, n.13, 2001.

FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANE, B., MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of β -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematologica, v. 84,** p. 387-396, 1996 .

GONCALVES, M.S.; NECHTMAN, J.F.; FIGUEIREDO, M.S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V.R.; SONATI, M.F.; SAAD, S.O.T.; COSTA, F.F.; STOMING, T.A. Sickle cell disease in a brasilian population from São Paulo: a study of the β^S haplotypes. **Hum. Hered.**, v. 44, p. 322-327, 1994.

GONCALVES, M.S.; BOMFIM, G.C.; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; BOMFIM, G.; ADORNO, E.V.; ALBUQUERQUE, A.L.; PONTES, A.; DUPUIT, M.F.; FERNANDES, G.B.; DOS REIS, M.G. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, n. 10, p. 1283-8, 2003.

GORDEUK, V.R.; DELANGHE, J.R.; LANGLOIS, M.R.; BOELAERT, J.R. Iron status and the outcome of HIV infection an overview. **J Clin Virol**, 20 (3) 111-115, 2001.

HEBBEL, R.P.; VERCELLOTI, G.M. The endothelial biology of sickle cell disease. **J Lab clin Med.**, v. 129, p. 288-293, 1997.

HOPPE C, KLITZ W, CHENG S, APPLE R, STEINER L, ROBLES L, GIRARD T, VICHINSKY E, STYLES L; CSSCD INVESTIGATORS. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**. Mar 15;103(6):2391-6. Epub 2003 Nov 13, 2004.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. 5th ed. New York : Garland Publishing. p 90-100, 2001.

KOCH W, LATZ W, EICHINGER M, ROGUIN A, LEVY AP, SCHÖMIG A, KASTRATI A. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. **Clin Chem.** Sep; v.48 p.1377-82, 2002.

KOCH W, LATZ W, EICHINGER M, ROGUIN A, LEVY AP. Haptoglobin gene subtyping by restriction enzyme analysis. **Clin Chem**, 49(11): 1937-1940, 2003.

KUTLAR, A. Sickle cell disease: multigenic perspective of a single-gene disorder. **Med. Princ. Prat.**, v. 14, p.15-19, 2005.

LANGHE V. [Haptoglobin polymorphism--not only a genetic marker]. **Anthropol Anz.** Dec;50(4):281-302, 1992.

LANGLOIS MR, DELANGHE JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clin Chem.** Oct;42(10):1589-600, 1996.

LANGLOIS MR, MARTIN ME, BOELAERT JR, BEAUMONT C, TAES YE, DE BUYZERE ML, BERNARD DR, NEELS HM, DELANGHE JR. The haptoglobin 2-2 phenotype affects serum markers of iron status in healthy males. **Clin Chem.** Oct;46(10):1619-25, 2000.

LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**.- 9^o ed. Philadelphia - London. Lea & Febirger, 1992.

LYRA, I.M.; GONCALVES, M.S.; BRAGA, J.A.; GESTEIRA, M.D.E. F.; CARVALHO, M.H.; SAAD, S.T.; FIGUEIREDO, M.S.; COSTA, F.F. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. **21**, n. 4, p. 1287-90, 2005.

LOUAGIE HK, BROUWER JT, DELANGHE JR, DE BUYZERE ML, LEROUX-ROELS GG. Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C. **J Hepatol**. Jul; 25(1):10-4, 1996.

MAEDA N. Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. The haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. **J Biol Chem**. Jun 10; 260(11):6698-709, 1985.

MAKIS, A.C.; HATZIMICHAEL, E.C.; BOURANTES, K. L. The role of citokines in sickle cell disease. **Ann. Hematol.**, v. **79**, p. 407-413, 2000.

MCGILL JR, YANG F, BALDWIN WD, BRUNE JL, BARNETT DR, BOWMAN BH, MOORE CM. Localization of the haptoglobin alpha and beta genes (HPA and HPB) to human chromosome 16q22 by in situ hybridization. **Cytogenet Cell Genet**. ;38(2):155-7, 1984.

MEIRA MELAMED-FRANK, ORIT LACHE, BENJAMIN I. ENAV, TAL SZAFRANEK, NINA S. LEVY, REBECCA M. RICKLIS, AND ANDREW P. LEVY. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood.**, v 98, p.3696-3699, 2001;

MELAMED-FRANK M, LACHE O, ENAV BI, SZAFRANEK T, LEVY NS, RICKLIS RM, LEVY AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood.** Dec 15;98(13):3693-8, 2001.

MICHAELS, L.A.; OHENE-FREMPONG, K.; ZHAO, H.; DOUGLAS, S.D. Serum levels of substance P are elevated in patients with sickle cell disease and increase further during vaso-occlusive crisis. **Blood.**, v. **92**, n. 9, p. 3148-51, 1998.

MOREIRA HW, NAOUM PC. Serum haptoglobin types in patients with hemoglobinopathies. **Hereditas.**v.113 p. 227-31, 1990.

MULLIS, K. B.; FALLONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase - catalized chain reaction. **Meth. Enzimol.**, v. **155**, p. 335-350, 1987.

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

NAGEL, R.L.; STEINBERG, M.H. Genetics of the α^S gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R.L. (eds.). **Disorders of hemoglobin – genetics, pathophysiology, and clinical management**. New York, USA. p. 711-755, 2001.

NEELY SM, GARDNER DV, GREEN D, TS'AO CH.. Effect of hematin on endothelial cells and endothelial cell-platelet interactions. **Am. J. Pathol.**v.115, p.390-396, 1984.

OHENE-FREMPONG, K.; STEINBERG, M.H. Clinical aspects of sickle cell anemia in adults and children. In: STEINBERG, M.H.; FORGET, B.G.; HIGGS, D.R.; NAGEL, R (eds.): **Disorders of hemoglobin- genetics, pathophysiology and clinical management**. New York: Cambridge University press. p. 611-670, 2001.

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

OPPENHEIM JJ. Cytokines: past, present, and future. **Int J Hematol.** Jul;74(1):3-8, 2001.

OSTROWSKI RS, TRAVIS JC, TALLEY ES. The association of Hp 1 and sickle cell disease. **Hum Hered.**; v.37 p.193-5,1987

PLATT, S. O.; BRAMBILLA, J. D.; ROSSE, F. W.; MILNER, F. P.; CASTRO, O.; STEINBERG, H. M.; KLUG, P. P. Mortality in sickle cell disease – Life expectancy and risk factors for early death. **New Engl. J. Med.**, v. 330, p.1639-1644, 1994.

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.** Dec; v.77; p.323-8, 2004.

POWARS, D.R. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 5, n. 3, p. 475-493, 1991.

QUINN, C.T.; ROGERS, Z.R.; BUCHANAN, G.R.. Survival of children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4023-7, 2004.

RAHGOZAR, S.; POORFATHOLLAH, A.A.; MOAFI, A.R.; OLD, J.M β^S Gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab Haplotype. **Am. J. Hematol.**, v. 65, p. 192-195, 2000.

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

RAUGEI G, BENSI G, COLANTUONI V, ROMANO V, SANTORO C, COSTANZO F, CORTESE R. Sequence of human haptoglobin cDNA: evidence that the alpha and beta subunits are coded by the same mRNA. **Nucleic Acids Res.** Sep 10;11(17):5811-9, 1983.

REDDING-LALLINGER, R.; KNOLL, C. Sick cell disease--pathophysiology and treatment. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, v. **36**, n. 10, p. 346-76, 2006.

SADRZADEH SM, BOZORGMEHR J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. **Am J Clin Pathol.** Jun;121 Suppl:S97-104, 2004.

SAIKI, R.K.; GEELFOND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. **239**, p. 487-491, 1988.

SALEH, A.W.; HILLEN, H.F.; DUITTS, A.J. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta Haematol.** v. **102**, n.1, p. 31-7, 1999.

SONATI, M.F.; FARAH, S.B.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F: High prevalence of α -Thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**, v. **15**, p. 309-311, 1991.

SILVA WS; LASTRA A; OLIVEIRA SF; KLUTAU-GUIMARÃES N; GRISOLIA CK. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Bahiano, Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, v. 22, p. 2561-2566, 2006.

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

STEINBERG, M.H: Genetic modulation of sickle cell anemia. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 209, p. 1-13, 1995.

STEINBERG, H. M.; FORGET, G. B.; HIGGS, R. D.; NAGEL, L. R. **Disordres of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management**. London: Cambridge, 2001.

STEINBERG, M.H.; RODGERS, G. P. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. **Semin. Hematol.**, v. 38, n. 4, p.299-306, 2001.

STEINBERG, M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** May;v.129 p.465-81, 2005.

SULEIMAN M., ARONSON D., ASLEH R., KAPELIOVICH M.R., ROGUIN A., MEISEL S.R., SHOCHA M., SULIEMAN A., REISNER S.A., MARKIEWICZ W., HAMMERMAN H., LOTAN R., LEVY N. S., LEVY A. P.,

Haptoglobin Polymorphism Predicts 30-Day Mortality and Heart Failure in Patients With Diabetes and Acute Myocardial Infarction. **Brief Genetics Report.** v. 54.p 2802-2806, 2005.

SULLIVAN KJ, KISSOON N, DUCKWORTH LJ, SANDLER E, FREEMAN B, BAYNE E, SYLVESTER JE, LIMA JJ. Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS I gene is associated with acute chest syndrome. **Am J Respir Crit Care Med.** Dec 15;164(12):2186-90, 2001.

SUTTON, M.; BOUHASSI, E.E.; NAGEL, R.L. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematol.**, v. 32, p. 66-69, 1989.

VAN VLIERBERGHE H, LANGLOIS M, DELANGHE J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. **Clin Chim Acta.** Jul;345(1-2):35-42, 2004.

ZAGO, M, A.; FALCÃO, P, R,; PASQUINI, R. **Hematologia, fundamento e prática.** 1. ed. São Paulo: Ed Atheneu. p. 241-248, 2004.

ZACCARIOTTO TR, ROSIM ET, MELO D, GARCIA PM, MUNHOZ RR, AOKI FH, DE FATIMA SONATI M. Haptoglobin polymorphism in a HIV-1 seropositive Brazilian population. **J Clin Pathol.** May;59(5):550-3, 2006.

WAGENER , FELDMAN E, DE WITTE T, ABRAHAM NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in vascular endothelial cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.216. p. 456-463, 1997.

WAGENER FA, VOLK HD, WILLIS D, ABRAHAM NG, SOARES MP, ADEMA GJ, FIGDOR CG. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. **Pharmacol Rev.** Sep;55(3):551-71. Epub 2003 Jul 17, 2003.

WANG, W.C.; LUKENS, J.N. Sick cell anemia and other sickling syndromes. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors. **Wintrobe's clinical hematology.** Baltimore (MD): Williams & Wilkins; p. 1346-1397, 1999.

WASSEL, J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab*, 46 (11-12): 547-52, 2000.

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

WINTROBE, M. M. Hematologia Clínica. São Paulo. Editora Manole Ltda. v.1.1998.

YANO A, YAMAMOTO Y, MIYAISHI S, ISHIZU H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Ned Okayama* ,Japão, v.52,n.4, p. 173-181,1998.

ANEXOS

ANEXO I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos _____, com 18 anos de idade ou mais, portador de plena saúde mental ou o seu responsável legal.....
.....a participar como voluntário na pesquisa sobre “Polimorfismos Gênicos da Haptoglobina na Anemia Falciforme: Possíveis Implicações nos Fenômenos Vaso-oclusivos e Resposta Imunológica” sob a coordenação de Dra. Marilda de Souza Gonçalves.

Nessa pesquisa serão investigados pacientes com anemia falciforme, ou seja, pacientes que apresentam alterações no DNA que podem mudar a forma das células vermelhas, que ficam menos deformadas, grudando nas veias. Além disso, as células vermelhas sofrem rompimento liberando uma substância que aumenta a ligação das células nas veias e todas juntas entopem os vasos causando dor, derrame, problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões.

Portanto, o DNA de algumas substâncias que ajudam a ligação das células às veias contribuindo para o seu entupimento será estudado.

As implicações da minha participação neste estudo, incluindo a natureza, duração, objetivo, métodos e meios através dos quais deve ser conduzido, bem como a ausência de riscos foram explicados pelo investigador (a) no HEMOBA.

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento retirar o meu consentimento e desistir de participar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos ao acompanhamento médico. Entretanto, exames adicionais poderão ser solicitados caso o médico que me assiste julgue-os necessários para a minha saúde e o meu bem estar. Minha recusa em participar do estudo não resultará em punições ou perdas dos benefícios aos quais eu já tenho direito.

Assinatura do responsável ou paciente: _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida ao responsável e /ou paciente de formular perguntas e testemunho a assinatura do voluntário neste documento.

Assinatura da testemunha 1: _____

Assinatura da testemunha 2: _____

Assinatura do investigador: _____

Data ____ / ____ / ____

Nome do investigador: Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Responsáveis pelo estudo:

Dra. Marilda Gonçalves

Cristiane Santos

Local da pesquisa:

Laboratórios de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz e Fundação HEMOBA. Telefone para contato: 3176-2226.

ANEXO II - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

1. Nome do Voluntário: _____

2. Registro: _____

3. Endereço:

4. Telefone: _____

5. Idade em anos: _____

6. Sexo:

() M

() F

7. Raça:

() Branca

() Negra

() Mulato claro

() Mulato médio

() Mulato escuro

8. Evento vaso-oclusivo:

() Sim

() Não

8.1 Quantos _____

8.2 Qual o tipo? _____

8.3 Qual a idade do primeiro evento? _____ e do último? _____

9. Já fez transfusão sanguínea? () Sim () Não

10. Caso sim, há quanto tempo? _____ (meses)

11. Paciente em estado estável

Sim

Não

12. Está fazendo uso de antiinflamatório ou antibiótico

Sim

Não

13. Caso sim, qual o antiinflamatório ou antibiótico?

14. Está fazendo uso de vitaminas?

Sim

Não

15. Caso sim, algum (s) deste (s)?

ácido fólico

vitaminas B₁₂

vitamina B₆

16. O paciente já apresentou algumas destas doenças?

Infecção Urinária

vaso-oclusão

Anemia hemolítica

AVC

Priapismo

Tuberculose

Pneumonia

Síndrome do quadrante superior direito

Retinopatia

() Úlcera de perna

() Necrose asséptica da cabeça do fêmur

18. Houve isolamento bacteriano em alguma das doenças acima relacionadas?

() *Haemophilus influenzae*

() *Streptococcus pneumoniae*

() *Escherichia coli*

() *Mycoplasma* spp

() *Chlamydia* spp

() *Staphylococcus* spp

() *Salmonella* spp

19. O paciente está apresentando algum (s) deste (s) sintoma (s)?

() Febre

() Tosse

() Coriza

() Dores Ósseas

() Dores no tórax ou no peito

() Dores abdominais

() Esplenomegalia

() Dispnéia