



FIOCRUZ

Universidade Federal da Bahia
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz



UFBA

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RISCO
EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME
EM CRISE VASO-OCCLUSIVA**

João Henrique de Oliveira Reis

**Salvador-BA- Brasil
2013**



FIOCRUZ

Universidade Federal da Bahia
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz



UFBA

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RISCO
EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME
EM CRISE VASO-OCCLUSIVA**

João Henrique de Oliveira Reis

Orientadora: Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Humana e Experimental da Universidade Federal da Bahia/Fundação Oswaldo Cruz

**Salvador-BA- Brasil
2013**

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

R375a Reis, João Henrique de Oliveira
Avaliação de biomarcadores de risco em pacientes com anemia falciforme em crise vaso-occlusiva.[manuscrito] / João Henrique de Oliveira Reis.- 2013.
75 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal da Bahia. Ministério da Saúde. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental 2013.
Orientadora: Profª Drª.: Marilda de Souza Gonçalves

1. Anemia Falciforme 2. Crise vaso-occlusiva 3. Infecção 4. Estado estável 5.
Biomarcadores de risco I. Título

CDU 616.155.194

AGRADECIMENTOS

Neste momento torna-se difícil encontrar as palavras certas para expressar meus agradecimentos às pessoas que participaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa. A todos gostaria de exprimir os maiores agradecimentos e aqui reconhecer a sua contribuição importante.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por permitir que eu pudesse obter essa conquista!

A minha querida orientadora “Pró” Marilda pelos ensinamentos, pela orientação, pelos conselhos no decorrer do Mestrado, e principalmente por acreditar na minha capacidade. Cheguei até aqui porque a senhora decidiu investir em mim, e por isso serei eternamente grato!

Aos meus pais que permitiram que o sonho de ser Mestre pudesse ser real.

A minha querida Bruna, que caminhou junto comigo desde a graduação, me incentivando e me apoiando. Vencemos mais uma etapa das nossas vidas!

A todos os colegas e amigos da FIOCRUZ que dedicaram tempo às discussões dos problemas que surgiram ao longo do trabalho. Obrigado também pelo seu apoio, compreensão, ânimo, atenção e carinho durante o mestrado. Em especial a Bruno e Daniela pela ajuda, pelo companheirismo e apoio prestado na realização desta pesquisa. Muito obrigado!!!

A Wendel e Magda que colaboraram com os resultados desta pesquisa.

A técnica de enfermagem Silene por me ajudar nas coletas dos pacientes do Hospital Irmã Dulce.

À FIOCRUZ por abrir suas portas para realização do mestrado e ao LPBM por disponibilizar tudo o necessário para a realização desta pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Página
RESUMO.....	10
INTRODUÇÃO.....	12
JUSTIFICATIVA.....	22
OBJETIVOS.....	24
DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
METODOLOGIA.....	26
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE A (TCLE).....	67
APÊNDICE B.....	69
APÊNDICE C.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia falciforme
AVE	Acidente vascular encefálico
AS	Heterozigose para hemoglobina S
CD11b/CD18 ou Mac-1	Antígeno macrofágico 1
CD11b	Integrina Alfa
CD18	Integrina Beta
CD32	Receptor de imunoglobulina
CD62L	L-selectina
CD142	Fator tecidual
DF	Doença Falciforme
ET-1	Endotelina 1
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
HbSS	Homozigose para a Hemoglobina S
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade do colesterol
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICAM-1s	Molécula de adesão intercelular-1 solúvel
I κ B	Proteína inibitória-kappa B
IL	Interleucina
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade do colesterol
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
NO	Oxido nítrico
PCR	Proteína C reativa
SRTN	Serviço de Referência de Triagem Neonatal da Bahia
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VCAM-1s	Molécula de adesão vascular 1 solúvel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos principais eventos fisiopatológicos presentes no desenvolvimento da vaso-oclusão na doença falciforme (adaptado de SEGEL *et al.*, 2010). O processo de vaso-oclusão compreende um evento complexo na qual estão envolvidos eritrócitos, reticulócitos, plaquetas, leucócitos, a adesão ao endotélio vascular, assim como o envolvimento de proteínas plasmáticas e fatores inflamatórios, como a expressão de citocinas pró-inflamatórias, levando a oclusão vascular e hipóxia.

Figura 2. Demonstração gráfica da correlação entre as variáveis hematológicas, bioquímicas, citocinas, moléculas de adesão e de superfície em pacientes HbSS em crise. (A) Correlação positiva entre plaquetas e leucócitos; (B) Correlação positiva entre VCAM-1s e hemoglobina; (C) Correlação positiva entre ICAM-1s e CHCM; (D) Correlação positiva entre VCAM-1s e linfócitos; (E) Correlação negativa entre CD32 e plaquetas; (F) Correlação negativa entre CD62L e plaquetas; (G) Correlação positiva entre sódio e plaquetas; e (H) Correlação negativa entre IL12 e hemoglobina. # Coeficiente de Correlação de Pearson, ## Coeficiente de Correlação de Spearman.

Figura 3. Associação entre os níveis séricos de TNF- α , VCAM-1s, IL-1 β , IL-10 e IL12 em 45 pacientes HbSS no estado estável (A, C, E e G) e 31 pacientes HbSS em crise (B, D, F e H). * teste Mann-Whitney, $p < 0.05$; ϕ Teste T independente, $p < 0.05$.

Figura 4. Correlação entre os níveis séricos de IL-1 β e as frações do colesterol. Correlação do níveis séricos de IL-1 β , HDL-c e LDL-c em 45 pacientes HbSS no

estado estável (A) e 31 pacientes HbSS em crise (B). Dados obtidos pelo coeficiente de correlação de Pearson.

Figura 5. Demonstração gráfica da correlação entre as variáveis bioquímicas, citocinas e moléculas de adesão solúveis em pacientes HbSS em crise. (A) Correlação positiva entre VCAMs e ácido úrico; (B) Correlação negativa entre IL12 e HDL-c; (C) Correlação negativa entre IL1 β e HDL-c; (D) Correlação positiva entre triglicérides e IL6; (E) Correlação negativa entre albumina e TNF- α ; (F) Correlação negativa entre LDH e TNF- α ; (G) Correlação negativa entre albumina e IL10; e (H) Correlação negativa entre albumina e IL6.

Figura 6. Avaliação da influência dos parâmetros bioquímicos (triglicérides e HDL-c) e citocinas (IL-12 e IL-8) nos eventos vaso-oclusivos, infecção e crise álgica em 31 pacientes HbSS em crise. * Teste Exato de Fisher.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histórico clínico dos pacientes com anemia falciforme em crise.

Tabela 2. Características demográficas e laboratoriais exibidas pelos indivíduos HbSS em crise avaliados neste estudo.

Tabela 3. Comparação dos indivíduos HbSS no estado estável e em crise avaliados neste estudo.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RISCO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM CRISE VASO-OCCLUSIVA-Dissertação Mestrado-, 2013. João H.O. Reis. Os indivíduos com anemia falciforme (HbSS) possuem quadro clínico heterogêneo, com alterações múltiplas em órgãos ou tecidos, que são secundárias a hemólise contínua e aos fenômenos de vaso-oclusão, sendo estes últimos decorrentes da falcização dos eritrócitos e da ativação de moléculas na superfície de leucócitos, plaquetas e células endoteliais, além do aumento de proteínas plasmáticas inflamatórias. O presente estudo teve como objetivo avaliar biomarcadores relacionados ao prognóstico em pacientes HbSS hospitalizados em crise e no estado estável, de maneira a identificar marcadores de risco para cada uma dessas fases da doença. A casuística foi composta por 31 pacientes HbSS em crise e 45 em estado estável provenientes do hospital pediátrico das Obras Sociais irmã Dulce (HPOSID) e da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do estado da Bahia (HEMOBA), respectivamente. O estudo foi aprovado pelo CEP do CPqGM da FIOCRUZ e os dados clínicos foram obtidos a partir da consulta aos prontuários médicos. A dosagem sorológica de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (ICAM-1s e VCAM-1s) solúveis foram realizadas pela reação de ELISA. A análise de moléculas na superfície dos leucócitos foi investigada por citometria de fluxo. A citocina IL-1 β teve correlação negativa significativa com a fração de LDL-c ($r=0,450$, $p=0,011$) nos pacientes HbSS em crise. Correlações positivas significativas foram observadas para a análise entre VCAM-1s e ácido úrico ($r=0,547$, $p=0,002$), triglicérides e IL6 ($r=0,547$, $p=0,00$). Em relação ao parâmetro HDL-c foi verificado que os pacientes que apresentaram níveis menores do que a média (percentil <50) tiveram risco de 11,6 vezes maior de desenvolver vaso-oclusão. Os pacientes HbSS que apresentaram níveis \geq a média (percentil ≥ 50) das citocinas IL-12 e IL-8 tiveram risco maior para o desenvolvimento de crise algica. Os pacientes HbSS em crise apresentaram níveis mais elevados para a AST e LDH quando comparados aos pacientes HbSS no estado estável; e os níveis de colesterol total, HDL-c e LDL-c foram menores nos pacientes HbSS em crise que nos pacientes no estado estável. Os níveis da citocina TNF- α estiveram associados aos níveis elevados de VCAM-1s, IL-1 β e IL-10 nos pacientes em crise, quando comparados aos pacientes no estado estável. Com base nos resultados, pode-se concluir que a citocina TNF- α está associada a elevação sérica de VCAM-1s nos pacientes HbSS em crise; o nível de triglicérides foi considerado fator protetor para o desenvolvimento de infecção nos pacientes HbSS em crise. Os pacientes que apresentaram níveis menores do que a média de HDL-c tiveram risco maior para o desenvolvimento de vaso-oclusão. Os pacientes HbSS que apresentaram níveis superiores a média de VCAM-1s apresentaram risco elevado para vaso-oclusão, tanto no estado estável quanto em crise. Verificou-se que existe correlação positiva significativa entre ácido úrico e VCAM-1s. Em conjunto, os nossos resultados indicam que moléculas distintas estão associadas ao período estável e de crise nas duas fases da HbSS investigadas, de forma a constituírem elementos importantes para estratégias voltadas ao desenho de fármacos e ao monitoramento clínico destes pacientes.

Palavras-chave: Anemia falciforme, crise vaso-oclusiva, infecção, estado estável, biomarcadores de risco.

ABSTRACT

EVALUATION OF BIOMARKERS OF RISK AMONG PATIENTS WITH SICKLE CELL DISEASE IN VASO-OCCLUSIVE CRISIS. João Henrique O. Reis. Sickle cell anemia (HbSS) individuals have heterogeneous clinical picture, with multiple changes in organs or tissues, which are secondary to ongoing hemolysis and vaso-occlusive phenomena, the latter are due to sickling of erythrocytes and molecules activation on the leukocytes, platelets and endothelial cells surface, as well as an increase of inflammatory plasma proteins. The aim of this study was evaluate biomarkers related to prognosis in HbSS patients hospitalized in crisis and in steady-state in order to identify markers of risk for each of these disease stages. A total of 31 HbSS patients in crisis and 45 in steady-state from the pediatric hospital of Obras Sociais irmã Dulce (HPOSID) and the Fundação de Hematologia e Hemoterapia Bahia state (HEMOBA) were studied respectively. The study was approved by the Research Board of CPqGM/FIOCRUZ and clinical data were obtained from medical records. Serum levels of cytokines, chemokines and solubles adhesion molecules (ICAM-1s and VCAM-1s) were investigated by ELISA. The analysis of leukocyte surface molecules was investigated by flow cytometry. The cytokine IL-1 β had a significant negative correlation with the fraction of LDL-C ($r = 0.450$, $p = 0.011$) in HbSS patients in crisis-state. Significant positive correlations were observed for the analysis of VCAM-1s and uric acid ($r = 0.547$, $p = 0.002$), triglycerides and IL6 ($r = 0.547$, $p = 0.00$). Regarding the parameter HDL-C was found that patients who had lower than average (percentile <50) had 11.6 fold greater risk of developing vascular occlusion. HbSS patients who had levels \geq average (percentile ≥ 50) cytokine IL8 and IL12 had a greater risk for the development of painful crises. Patients HbSS in crisis-state had higher levels for AST and LDH compared to HbSS steady-state patients and the levels of total cholesterol, HDL-c and LDL-c were lower in HbSS patients in crisis-state than in patients in steady-state. Levels of the cytokine TNF- α were associated with elevated levels of VCAM-1s, IL-1 β and IL-10 in patients in crisis-state when compared with patients in steady-state. Based on the results, we can conclude that the cytokine TNF- α is associated with an increase of serum VCAM-1s in HbSS patients in crisis-state, the triglyceride level was considered a protective factor against the development of infection in patients in crisis-state. HbSS patients with HDL-C levels lower than average had an increased risk for the vaso-occlusion development. HbSS patients who had higher than average levels of VCAM-1s showed elevated risk for vaso-occlusion in both steady-state and in crisis-state. It has been found that there is positive correlation between uric acid and VCAM-1s. Based on the results, it is concluded that different molecules are associated with the steady and crisis-state, the two stages studied in HbSS, which can constitute an important element in the design of drugs strategies of and clinical monitoring of these patients.

Keywords: Sickle cell anemia, vaso-occlusive crisis, infection, steady-state, biomarkers of risk.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Anemia Falciforme

A hemoglobina (Hb) é a principal proteína presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e tem como função principal o transporte de oxigênio (O₂) e parte do dióxido de carbono (CO₂). A Hb possui estrutura esférica e globular, com aproximadamente 64-KDa, sendo formada por quatro subunidades, organizadas por cadeias polipeptídicas ou globinas, geralmente iguais duas a duas. Dessa forma, as cadeias de globina na molécula de Hb apresentam um par de cadeias do tipo alfa e outro de cadeias do tipo não-alfa. As cadeias de globina são quimicamente unidas ao grupamento prostético denominado heme, que é composto pelo átomo de ferro no estado ferroso (Fe⁺²) ligado a protoporfirina IX. Esse grupamento possui sítios que facilitam a ligação e/ou liberação do oxigênio para os tecidos (PERUTZ *et al.*, 1960; BUNN & FORGET, 1986; PACE & ZEIN, 2006; STEINBERG, 2009).

As alterações hereditárias que ocorrem na molécula Hb são denominadas hemoglobinopatias e se referem a um grupo de doenças caracterizadas por desordens autossômicas recessivas, onde existem alterações em genes responsáveis pela síntese das cadeias polipeptídicas presentes na molécula. De forma geral, as hemoglobinopatias podem ser divididas em dois grupos principais, as estruturais e as de síntese (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998; TRENT, 2006). As hemoglobinopatias estruturais são decorrentes de mutações que envolvem substituições simples, inserções ou deleções de nucleotídeos que podem alterar as regiões codificadoras dos genes e, conseqüentemente, contribuir para a substituição de aminoácidos (aa) na proteína, dando origem a Hbs variantes. Essas alterações estruturais podem comprometer as propriedades físico-químicas e funcionais da Hb, sempre com base no tipo da mutação e

na sua localização (FRENETTE & ATWEH, 2007). As síndromes talassêmicas representam as alterações genéticas monogênicas mais prevalentes na população mundial e são caracterizadas pela redução ou ausência de produção na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da Hb, com desequilíbrio entre essas subunidades, dificuldades no processo de eritropoese, com hemoglobinizacão deficiente dos eritroblastos (MUNCIE & CAMPBELL, 2009).

No Brasil, em decorrência do grau elevado de miscigenação da população, a incidência e prevalência de hemoglobinopatias variam de acordo com a fixação regional dos principais grupos raciais colonizadores (NAOUM, 1997; ZAGO, 1986), sendo comum a presença de hemoglobinopatias estruturais, como a HbS e HbC na região nordeste, e de hemoglobinopatias de síntese, como a talassemia α e β na região sul e sudeste.

A hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina variante que possui frequência mundial elevada e resulta da substituição do ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia polipeptídica beta (β), sendo decorrente da mutação pontual $GAG > GTG$ no sexto códon do gene beta (*HBB*). Os homozigotos para o alelo beta S (β^S) da HbS possuem anemia falciforme (HbSS), sendo que os diferentes genótipos que emergem da associação da HbS a outras Hbs variantes ou de síntese, tais como a doença SC (HbSC) e a talassemia S β (S β Thal), e que cursam com manifestação clínica são denominados de maneira geral como pertencentes aos grupos de doença falciforme (DF). Entretanto, os heterozigotos para HbS, também denominado traço falciforme ou indivíduos AS (HbAS), não estão incluídos na classificação de DF, uma vez que são assintomáticos (STEINBERG *et al.*, 2006; MURAO & FERRAZ, 2007).

O traço falciforme é uma condição relativamente comum e assintomática presente no indivíduo que herda de um dos pais o alelo β^A e do outro o alelo β^S . É

bastante relatado na literatura que a heterozigose e a homozigose para a HbS são frequentes em populações com descendência africana (STEINBERG, 2009). Entretanto, evidências científicas demonstram que essa Hb tem significância epidemiológica entre grupos populacionais variados, como os da Itália, Grécia, Turquia, Arábia Saudita, Índia, Paquistão, Bangladesh, China e Cyprus (NIETERT *et al.*, 2002).

A distribuição global da HbS decorre da combinação de dois fatores, a seleção de portadores do alelo mutante pela vantagem evolutiva em regiões onde a malária é endêmica e a imigração de africanos devido ao tráfico de escravos (REES *et al.*, 2010). A presença do alelo mutante para a HbS possui distribuição variada na população africana, sendo que a região central da África Subsaariana apresenta frequência acima de 30%. Na Europa e na América do Norte a frequência do alelo mutante para a HbS varia de 0-3% (REES *et al.*, 2010). No Brasil, a frequência do alelo β^S varia de acordo com a região estudada. No estado de Minas Gerais a incidência é estimada na proporção 1:250 nascimentos para a DF (NIETERT *et al.*, 2002), enquanto no estado de São Paulo foi observada a frequência de 6,6% para os indivíduos HbAS entre os descendentes de africanos (RAMALHO, 1986). A frequência do genótipo HbAS foi de 7,4% após a avaliação de 1200 crianças em idade escolar no estado da Bahia (AZEVEDO *et al.*, 1980). Adorno e cols. (2005) estudaram recém-nascidos de Salvador-BA e descreveram a frequência de 9,8% para os indivíduos HbAS e a incidência de 0,2% para os indivíduos HbSS.

Por apresentar prevalência elevada no Brasil, o diagnóstico da DF passou a ser realizado pelo teste de triagem neonatal ou teste do pezinho, desde junho de 2001, com a criação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), juntamente com a triagem do hipotireoidismo congênito, da fenilcetonúria e da fibrose cística (SERJEANT, 2000; RAMALHO *et al.*, 2003). De acordo com o programa de triagem

neonatal brasileiro, o Rio de Janeiro possui a incidência de 1:1200 para a DF e a frequência de indivíduos HbAS é de 1:21; em Minas Gerais a incidência de DF é de 1:1400 e a frequência dos HbAS é de 1:23. Com base nesses dados estima-se o nascimento de 3.500 crianças com DF e 200.000 HbAS/ ano no Brasil (Ministério da Saúde, 2009). Amorim e cols. (2010) descreveram com base nos dados obtidos na triagem neonatal do estado da Bahia, realizada pela Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE-SSA), a incidência de 1:601 para a DF e de 1:1435 para a HbSS. Ressaltamos que o estado da Bahia é aquele que apresenta a prevalência para a DF mais elevada do Brasil. No Brasil, estima-se que a DF acometa até 0,3% da população negra, podendo ser mais significativa em decorrência do grau elevado de miscigenação racial (DI-NUZZO & FONSECA, 2004; GUIMIERO *et al.*, 2007).

1.2 Alterações patológicas e vasooclusiva na Anemia Falciforme

A HbSS é caracterizada pela presença de hemólise crônica e recorrente, anemia crônica, suscetibilidade a infecções, crises agudas de dor decorrentes de microinfartos e disfunção de diversos órgãos. Desta forma, os indivíduos HbSS possuem quadro clínico heterogêneo, com retardo no crescimento e desenvolvimento, além de alterações múltiplas em órgãos ou tecidos como coração, rins, pulmão, cérebro, ossos e fígado, que ocorrem sempre provenientes da hemólise contínua e dos fenômenos de vaso-oclusão. O aumento da susceptibilidade a infecções é favorecido pela asplenia funcional que ocorre progressivamente e dificulta a opsonização de bactérias encapsuladas (SONATI & COSTA, 2008). A HbSS possui morbidade e mortalidade elevadas, principalmente em decorrência de infecções (STEINBERG, 2001; STEINBERG, 2009), sendo importante o diagnóstico e acompanhamento precoce desses pacientes.

A membrana dos eritrócitos com HbS está constantemente exposta a danos mecânicos que provocam hemólise, com presença de anemia hemolítica intravascular e extravascular crônica. Esse processo hemolítico causa a liberação de Hb livre e da enzima arginase eritrocitária no plasma, com a ocorrência de disfunção endotelial, proliferação vascular, estresse oxidativo e inflamação (ASLAN, 2007; ATAGA *et al.*, 2008). Os biomarcadores de hemólise são importantes na avaliação do paciente com AF (VILAS-BOAS, 2011). A lactato desidrogenase (LDH) é um marcador de hemólise intravascular, sendo que a sua elevação plasmática está associada ao subfenótipo clínico de hipertensão pulmonar, priapismo e úlcera nos pacientes HbSS (VILAS-BOAS, 2011; KATO *et al.*, 2006). As concentrações das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e dos níveis de bilirrubina, principalmente a indireta, estão alteradas durante o processo de hemólise (ROTHER *et al.*, ; BOAS, 2011).

A vaso-oclusão ou obstrução de vasos sanguíneos é um dos principais sintomas clínicos presentes na HbSS, sendo decorrente da falcização dos eritrócitos após formação de polímeros de HbS próximo à membrana. Atualmente tem sido associado a esse fenômeno o papel importante desempenhado pelos leucócitos, plaquetas, reticulócitos, proteínas plasmáticas e endotélio vascular. As alterações ocorridas na vaso-oclusão apresentam-se, preferencialmente, nas veias pós-capilares e são intensificadas por estímulos de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, secretadas em células endoteliais, leucócitos e plaquetas, que estimulam tanto o recrutamento quanto a ativação endotelial (OKPALA, 2004).

O fenômeno da oclusão microvascular é uma característica fisiopatológica da DF, sendo um processo multifatorial bastante complexo (EMBURY *et al.*, 1994), que depende, em geral, da concentração de polímeros de HbS que são formados na

circulação sanguínea. A presença desse fenômeno torna o fluxo dos eritrócitos em formato de foice mais lento na microcirculação (LUBIN, 1997; GIBSON & ELLORY, 2002), com a adesão endotelial dos mesmos, que é seguida do acúmulo secundário de células menos deformadas (LUBIN, 1997; ATAGA & ORRINGER, 2003), fato que parece ser responsável pelo início dos eventos vaso-oclusivos nos indivíduos HbSS. Esses eventos representam mecanismos complexos e multifatoriais que envolvem interações entre os eritrócitos, células endoteliais, leucócitos, plaquetas, fatores da coagulação e proteínas plasmáticas (REITER *et al.*, 2002; ETIENNE-JULAN *et al.*, 2004). O processo de vaso-oclusão está resumido na figura 1.

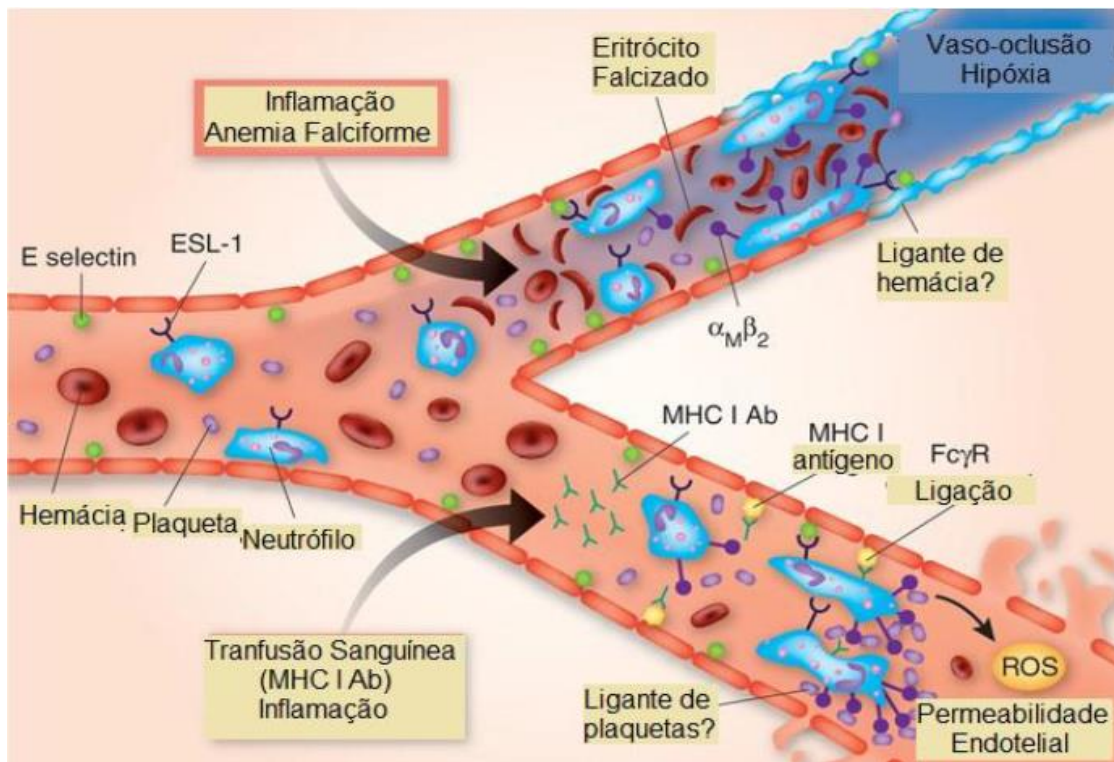


Figura 1. Representação dos principais eventos fisiopatológicos presentes no desenvolvimento da vaso-oclusão na doença falciforme (adaptado de SEGEL *et al.*, 2010). O processo de vaso-oclusão compreende um evento complexo no qual estão envolvidos eritrócitos, reticulócitos, plaquetas, leucócitos e a adesão ao endotélio vascular, assim como o envolvimento de proteínas plasmáticas e fatores inflamatórios, como a expressão de citocinas pró-inflamatórias, levando a oclusão vascular e hipóxia.

Diferentes pesquisas relatam que o endotélio vascular dos indivíduos com DF encontra-se alterado, uma vez que as células endoteliais desses pacientes possuem o

aumento na expressão de moléculas de adesão (MATSUI *et al.*, 2002; ATAGA & KEY, 2007), tais como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM -1), E-selectina e P-selectina. É observado que a expressão dessas moléculas de adesão está aumentada no endotélio vascular mesmo em pacientes com DF no estado estável; porém, sua manifestação se acentua durante as crises de dor e hemólise. Entretanto, a ativação crônica do endotélio parece ser responsável pela vasculopatia dos vasos de grandes e pequenos calibres (ATAGA & KEY, 2007).

Assim como as células endoteliais, os polimorfonucleares circulantes dos pacientes com DF também exibem fenótipo ativado. Isso é demonstrado pela expressão de integrinas $\beta 2$ ativadas (LUM *et al.*, 2004) e da citocina indutível CD64 (Fc γ RI) (FADLON *et al.*, 1998), pelo aumento da liberação de leucócitos e pelo aumento da expressão de L-selectina e CD16 (Fc γ RIII) (LARD *et al.*, 1999). Os eritrócitos falcizados também possuem papel importante na interação com o endotélio (HARLAN, 2000; OKPALA, 2000; HEBBEL *et al.*, 2004), uma vez que expressam em sua superfície glicopeptídeos sulfatados, fosfatidilserina, CD36 e integrina $\alpha_4\beta_1$, alterações demonstradas em estudos desenvolvidos em modelos animais e *in vitro*. O mecanismo de adesão é mediado por receptores localizados nas membranas dos eritrócitos falcizados, leucócitos, plaquetas e nas células endoteliais (MONTES *et al.*, 2002). As hemácias falcizadas pró-adesivas se ligam a P-selectina, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, que se tornam ativadas (PATHARE *et al.*, 2002).

Os leucócitos podem contribuir de maneira significativa para que ocorra o fenômeno da vaso-oclusão em pacientes com DF (ANYAEGBU *et al.*, 1998), uma vez que estes são capazes de aderir ao endotélio vascular. Estudos na microcirculação em animais transgênicos com DF mostraram as alterações provenientes da resposta inflamatória subsequente a hipóxia seguida da reoxigenação, ocorrendo aumento da

adesão e migração dos leucócitos e produção de radicais livres de oxigênio que contribuem para a inflamação do endotélio e dano tecidual (KAUL & HEBBEL, 2000; TURHAN *et al.*, 2002; ZENNADI *et al.*, 2008). As células de pacientes com DF apresentam expressão elevada de ligantes para as moléculas de adesão, com aumento do número de leucócitos ativados durante o episódio de infecção e crises, sendo estes responsáveis por secretar citocinas inflamatórias que ativam o endotélio vascular, não ficando restrito apenas ao local da inflamação, mas também em outras partes do organismo. Além disso, proteínas citotóxicas e substâncias vasoativas como leucotrienos atraem e recrutam outros leucócitos para o local da inflamação. Os leucócitos ativados expressam mais moléculas de adesão que aqueles no estado basal; dessa forma, ligam-se mais rapidamente ao endotélio ativado, o que leva à isquemia, infarto, dor e vaso-occlusão (OKPALA, 2004; SOUZA, 2008).

1.3 Biomarcadores de vasoocclusão

As três etapas principais na adesão e ativação dos leucócitos são: (1) os leucócitos rolam ao longo da superfície do endotélio; (2) em seguida ocorre a ativação dos leucócitos; e (3) por fim ocorre o processo de adesão. A primeira etapa, ou seja, a rolagem dos leucócitos é considerada um pré-requisito essencial para que ocorra a adesão leucocitária junto ao endotélio, sendo modulada pelas moléculas presentes na superfície do endotélio, E e P-selectinas (POLANOWSKA-GRABOWSKA *et al.*, 2010). Moléculas como a VCAM-1 e ICAM-1 também participam da adesão leucocitária, uma vez que são responsáveis pela adesão firme dos leucócitos ao endotélio. A presença de algumas citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1-beta (IL-1 β) são responsáveis por regular a expressão de moléculas

de adesão presentes na superfície de leucócitos e das células endoteliais. Estudos evidenciam que ambos, TNF- α e IL-1 β possuem suas concentrações elevadas em soros de pacientes com DF no estado estável (OKPALA, 2004; HEBBEL *et al.*, 2004), e isso ocorre, provavelmente, devido à inflamação causada pela aderência anormal dos eritrócitos falcizados ao endotélio da microcirculação, produzindo assim o processo de isquemia tecidual (NAGEL, 1991; EMBURY *et al.*, 1994; LUBIN, 1997; KIM *et al.*, 2003).

O fator tecidual é um iniciador importante da cascata da coagulação e sua expressão está aumentada nos pacientes HbSS, principalmente nos episódios de dor aguda (STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010). O fator tecidual está presente na superfície celular como uma proteína integral de membrana, sendo que em condições fisiológicas, o fator tecidual não é expresso em células de contato direto com o sangue, tais como células endoteliais e leucócitos (STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010). Numerosos componentes plasmáticos podem aumentar a expressão do fator tecidual em células hematopoiéticas e/ou em células endoteliais, tais como trombina, endotoxina e proteína C reativa (PCR) (STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010).

As células endoteliais liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e vasoconstritor potente, que atua em artérias e veias de grandes e pequenos calibres, sendo que esse peptídeo aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis (VCAM-1s e ICAM-1s), e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos. As plaquetas são estimuladas pela presença dessas citocinas inflamatórias e liberam o fator von Willebrand (FvW) armazenado nos grânulos- α e que favorecem a ligação entre plaquetas, endotélio e o eritrócito falciforme. Os neutrófilos ativados pelas citocinas inflamatórias são recrutados para o

sítio inflamatório, aumentam a produção de peróxidos e expõem quantidade maior de moléculas de adesão em sua superfície, facilitando a adesão ao endotélio, a outros neutrófilos, a plaquetas, reticulócitos, eritrócitos e eritrócitos falcizados, culminando nos fenômenos vaso-oclusivos observados na DF (MCLNTYRE *et al.*, 2003; ZAGO & PINTO, 2007).

Existem muitas evidências de que as plaquetas circulantes dos pacientes com DF estão cronicamente ativadas, contribuindo para o estado "hipercoagulável" observado nesta patologia (LUBIN, 1997; CAPPELLINI, 2007; GLADWIN & KATO, 2008). Um dos principais fatores que contribuem para a vaso-oclusão em pacientes com DF parece ser o estado de hipercoagulabilidade ou pró-trombótico (ATAGA, 2003; STYPULKOWSKI & MANFREDINI, 2010). Isso pode ser atribuído a fatores, tais como alterações na cascata de coagulação que levam ao aumento da geração de trombina, esgotamento das proteínas anticoagulantes C e S (HAGGER *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1997) , e/ou outras alterações, como o aumento na contagem e atividade de plaquetas (SETTY *et al.*, 1991; HAGGER *et al.*, 1995).

Os marcadores da ativação plaquetária P-selectina, CD40-L, fator plaquetário 4 (FP4) e β -tromboglobulina estão aumentados em pacientes com DF quando comparados aos indivíduos sadios (WUN *et al.*, 1997; KURANTSIN-MILLS *et al.*, 1998; LINDMARK *et al.*, 2000). Os indivíduos com DF também têm diminuição do conteúdo de trombospondina-1 plaquetária, relacionada com a ativação plaquetária precoce (BROWNE, 1996).

O aumento da expressão de P-selectina na superfície de plaquetas (WUN *et al.*, 1997; TOMER *et al.*, 2001), ou o aumento dos níveis plasmáticos de P-selectina solúvel (BLANN *et al.*, 2003; CHAPMAN *et al.*, 2003) estão tornando-se evidências de ativação plaquetária. A P-selectina (CD62P) é uma molécula de adesão que facilita a

adesão de plaquetas ao endotélio e leucócitos, sendo um componente da membrana do corpo de Weibel-Palade do endotélio, da membrana plaquetária e dos grânulos alfa e densos. Durante a ativação e adesão das plaquetas, os grânulos alfa são mobilizados para que a P-selectina se distribua na superfície, sendo posteriormente derramada no plasma (MOHAN *et al.*, 2006).

Diante do exposto, tendo como base a amplitude de eventos e a diversidade de mecanismos presentes na DF, julgamos de interesse a investigação de biomarcadores que possam estar associados com a gravidade da doença e que possam ser instituídos como característicos da fase estável e do estado de crise desses pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde, nascem no Brasil 3.500 crianças por ano com DF e 200.000 com HbAS. Estima-se ainda que 7.200.000 pessoas sejam portadoras HbAS e que entre 25.000 a 30.000 sejam HbSS (FELIX *et al.*, 2010). Os dados de triagem neonatal realizados pela APAE-Salvador, que possui Serviço de Referência de Triagem Neonatal da Bahia (SRTN), revelam que a incidência de DF é de 1:645 nascimentos, sendo a Bahia o estado brasileiro que apresenta a frequência mais elevada do alelo β^S e a incidência mais elevada da doença no Brasil (AMORIM *et al.*, 2010).

Os sinais e sintomas clínicos estão relacionados à anemia grave, complicações vaso-oclusivas e hiperbilirrubinemia crônica, sendo a crise vaso-oclusiva o principal deles (MANN-JILLES & MORRIS, 2009). Trata-se, portanto, de uma doença crônica, que geralmente traz grau elevado de sofrimento aos seus portadores, que merece atenção especial do ponto de vista médico, genético e psicossocial (SERJEANT, 1985; ZAGO, 1986; MANKAD, 1991). A clínica apresentada pelos indivíduos HbSS é

variada, com fatores prognósticos classicamente associados, tais como haplótipos ligados aos genes da globina beta S e talassemia alfa2 por deleção de 3.7Kb, além de marcadores ambientais e sócio-econômicos (LYRA *et al.*, 2005).

A avaliação da expressão de moléculas de adesão em pacientes em crise é de grande interesse científico, visto que pode contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelos fenômenos vaso-oclusivos, que até o presente momento não foram totalmente elucidados.

Diante da grande relevância mundial apresentada pela HbSS, foi realizada a avaliação da expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 solúveis e outros biomarcadores de prognóstico, como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 em pacientes pediátricos com HbSS em crise, no estado estável e em um grupo de indivíduos sadios. Ressalta-se que a realização do presente estudo contribuirá para a geração de conhecimento relativo a importância das moléculas de adesão e de suas associações com moléculas normalmente utilizadas na rotina laboratorial e com manifestações clínicas presentes na HbSS, de maneira que possam subsidiar estudos que busquem a utilização de fármacos novos e de estratégias novas de acompanhamento para estes pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar moléculas de superfície em leucócitos e moléculas de adesão solúveis associando-as ao perfil hematológico, bioquímico, clínico e níveis séricos de citocinas em pacientes HbSS em crise e estado estável da doença.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão de moléculas de superfície (CD11b, CD18, CD32, CD42L, CD54 e CD142) em leucócitos e moléculas de adesão solúveis (VCAM-1s e ICAM-1s) em pacientes HbSS pediátricos;
2. Quantificar os níveis de citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IL-12 e IL-10) nos grupos de pacientes estudados;
3. Correlacionar os dados do perfil clínico, bioquímico e hematológico com a expressão e níveis de moléculas de adesão solúveis e de moléculas de superfície em leucócitos nos pacientes estudados.

4. DESENHO EXPERIMENTAL

A **Figura 2** representa esquematicamente o delineamento utilizado no presente estudo.

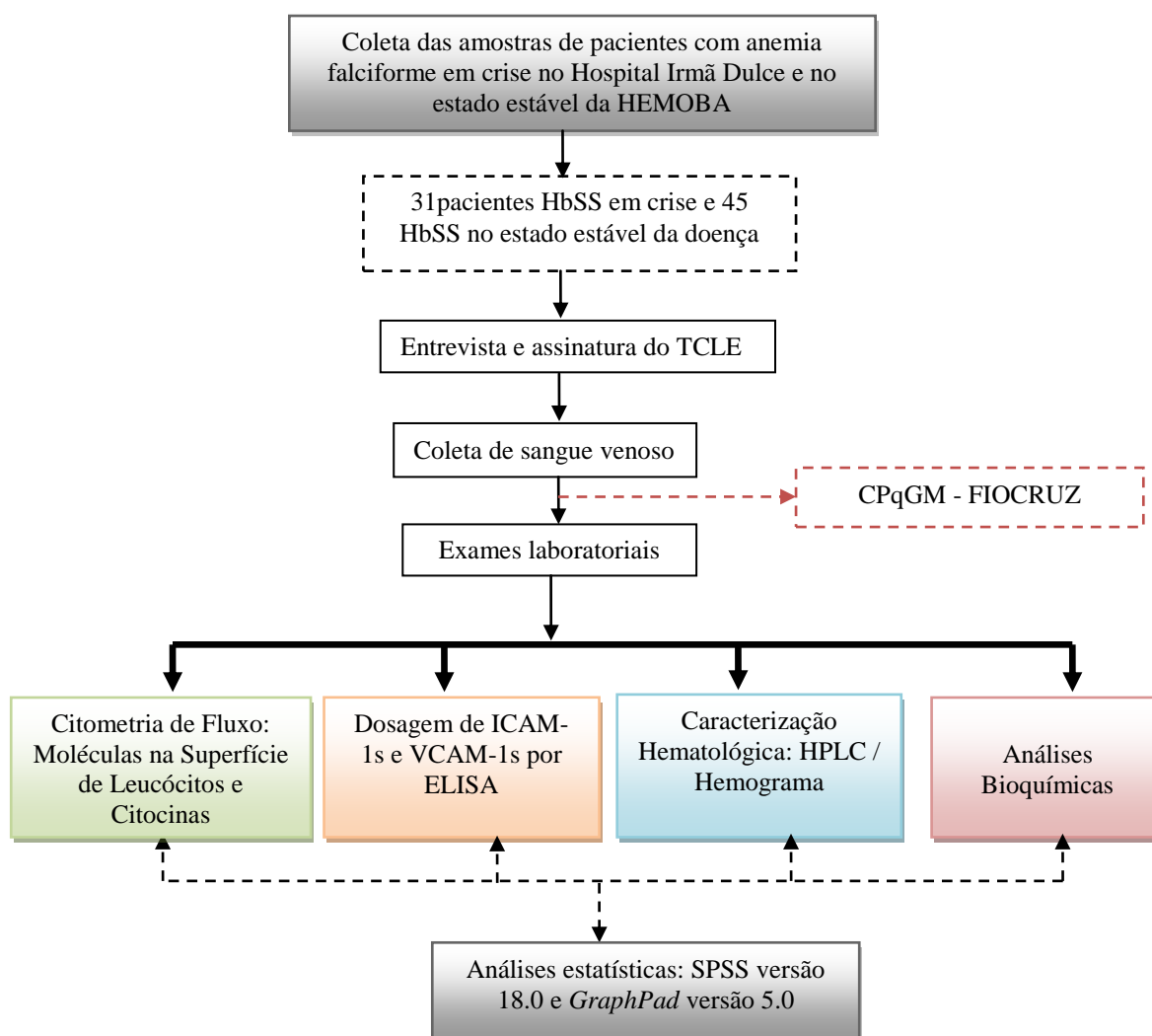


Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental do estudo.

4.1 Casuística:

Foram avaliados 31 pacientes HbSS em crise pediátricos, no momento da hospitalização no Hospital Pediátrico das Obras Sociais Irmã Dulce (HPOSID) e 45 pacientes em estado estável da doença em seguimento na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do estado da Bahia (HEMOBA). Considerou-se como critérios de inclusão os pacientes que apresentaram o perfil de hemoglobinas compatível com a DF do tipo HbSS e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) pelo responsável legal do paciente em questão.

Foram considerados como critérios de exclusão a recusa em assinar o TCLE, a ausência de dados no prontuário desses pacientes, a não confirmação do perfil de hemoglobinas HbSS, a sorologia positiva para os vírus HCV, HBV, HTLV I / II e HIV e uso de hemocomponentes no período da coleta de amostras.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM/FIOCRUZ-BA, conforme a resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde, CAAE 0012.1.225.000-07 (PARECER 205/2009; Protocolo 306) (APÊNDICE B).

5. METODOLOGIA

5.1 Coleta das amostras

Foram coletados 10 mL de sangue total de cada paciente, sendo 5 mL em EDTA (sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético), na concentração de 1,5 mg/mL \pm 0,25, conforme metodologia proposta por Dacie & Lewis (2006), para as análises hematológicas e 5mL sem aditivo para a obtenção do soro destinado as dosagens.

5.2 Coleta de dados clínicos

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos pelo preenchimento de um questionário pelos pacientes ou pais/responsável legal (Apêndice C).

As informações adicionais referentes aos pacientes foram obtidas pela consulta aos prontuários médicos no ambulatório pediátrico do HPOSID e da HEMOBA.

5.3 Análises hematológicas

A caracterização hematológica foi realizada em contador eletrônico de células *Coulter Count T-890* (Coulter, Cidade e país). A contagem diferencial dos leucócitos foi avaliada em esfregaços sanguíneos corados pelo *Wright* e o número de reticulócitos em esfregaços corados pelo azul de cresil brilhante.

5.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas (perfil hepático, renal, lipídico, inflamatório e hemolítico) foram realizadas por método automatizado nos equipamentos A25 (BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain); Access 2 (BECKMAN COULTER Inc, CA, USA) e no Image (BECKMAN COULTER Inc, CA, USA).

5.5 Dosagem sorológica de citocinas e quimiocinas

A reação de ELISA para detecção das citocinas foi realizada por captura anticorpo anti-citocina 2 ug/mL em solução contendo 0,1M Na₂HPO₄ (*BD Biosciences Pharmingen, USA*) no volume de 100uL por poço durante 12 horas a 4°C; posteriormente, foi realizado o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas pelo acréscimo de 200 uL de tampão fosfato salino/soro fetal bovino a 10% (PBS/FBS) por poço, seguido de incubação por 1 hora a 25°C e de 3 lavagens em PBS/TWEEN 0,05%.

Os padrões e amostras de soro foram adicionados em volume de 100uL por poço, sendo o padrão diluído seriadamente (1:2) com ponto final da curva em 2000 pg/ mL. A reação foi incubada por 1 hora a 25°C, seguida de 4 lavagens consecutivas em PBS/TWEEN a 0,05%. Após esta etapa foram adicionados 100uL do anticorpo de detecção (1ug/mL) diluído em tampão de bloqueio contendo Tween (*BD Biosciences Pharmingen*), incubados por 1 hora a 25°C e lavados em PBS/TWEEN 0,05%. Após a lavagem foram adicionados 100uL de peroxidase (HPR) diluída em tampão de bloqueio TWEEN (*BD Biosciences Pharmingen*), seguido de incubação por 30 minutos a 25°C e cinco lavagens em PBS/TWEEN a 0,05%. Após a lavagem em PBS/TWEEN foram adicionados 100uL por poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB) em H₂O₂ (*BD Biosciences Pharmingen*), sendo a mistura incubada a 25°C até o aparecimento de coloração azulada. A reação foi parada após a adição de 50uL de ácido sulfúrico 8N, com leitura posterior a 450nm.

5.6 A análise por citometria de fluxo

A análise de moléculas na superfície dos leucócitos foi determinada pela técnica de citometria de fluxo. Antes da incubação com o anticorpo monoclonal específico, as células foram incubadas com e sem 75 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (*Sigma, Escherichia coli* 026:B6) por uma hora. Cada experimento foi desenvolvido em duplicata.

Alíquotas de 50 µL de sangue total com e sem LPS foram incubadas com 2 µL de anticorpo monoclonal não conjugado dirigidos contra CD11b, CD18, CD32, CD62L, CD54 e CD142 por 15 min em temperatura ambiente e no escuro. As hemácias foram lisadas em 1,3 mL de solução de lise (*BD Biosciences-Pharmigen, San Jose, CA, EUA*) por 10 minutos a 25°C na ausência de luz. Em seguida a lise das hemácias, o sangue foi

centrifugado a 1000 rpm por 10 min a 25°C e ressuspenso em PBS. As células foram analisadas a 488nm em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose CA, EUA) e os resultados foram expressos como a média de unidades de intensidade de fluorescência para os marcadores estudados.

5.7 Dosagem de moléculas de adesão solúveis (ICAM-1s e VCAM-1s)

As moléculas de adesão solúveis foram analisadas pela técnica de ELISA. Inicialmente as placas foram preparadas com 100 uL dos anticorpos de captura previamente diluído, que tiveram os sítios inespecíficos e bloqueados com 300 uL de solução de bloqueio durante uma hora a temperatura ambiente; na etapa seguinte foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem (PBS/TWEEN 20). Após o bloqueio, foram adicionadas as amostras e os padrões diluídos seriadamente, seguidos de duas horas de incubação a temperatura ambiente e na etapa seguinte foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem; 100 uL dos anticorpos de detecção foram adicionados e incubados por duas horas a temperatura ambiente e na etapa seguinte foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem, sendo adicionados, posteriormente, 100uL do streptavidina-HRP por 20 minutos a temperatura ambiente. Na etapa seguinte foram realizadas 3 lavagens com tampão de lavagem, seguido de incubação com 100uL do substrato por 20 minutos a temperatura ambiente. O término da reação foi realizado com o acréscimo de 50uL de solução de parada, sendo a leitura realizada a 450 nm (R & D, England).

5.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas EPI INFO versão 6.04, SPSS versão 18.0 e o Graphpad versão 5.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para as análises realizadas.

A análise de normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação, foram utilizados testes paramétricos ANOVA ou não paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise de variáveis numéricas, na comparação de três ou mais grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição individual de cada variável.

O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, para se verificar a provável diferença entre as médias dos valores, foram realizadas entre as médias que apresentaram diferenças significativas, comparações múltiplas de médias pelo teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições não normal.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. O teste exato de Fisher foi utilizado para as análises de valores inferiores a quatro. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

6. RESULTADOS

O presente estudo investigou 31 indivíduos HbSS em crise, sendo 15 (48,4%) do sexo feminino. A análise da distribuição de idade demonstrou que a idade média dos pacientes era de $10,34 \pm 4,36$ anos, sendo 15/31 (48,4%) com idade inferior a média encontrada.

A **Tabela 1** mostra o histórico clínico dos 31 pacientes HbSS em crise, dados que foram obtidos a partir da pesquisa nos prontuários clínicos durante o período de internação no HPOSID. As principais características clínicas observadas nos pacientes HbSS foram as crises vaso-oclusivas, presentes em 22/31 (70,1%), crises de dor em 22/31 (70,1%), infecções em 22/31 (70,1%), febre em 11/31 (35,5%) e pneumonia em 8/31 (25,8%).

Tabela 1. Histórico clínico dos pacientes com anemia falciforme em crise.

Histórico clínico	Pacientes (N)	Frequência (%)
Eventos vaso-oclusivos	22/31	70,1
Pneumonia	8/31	25,8
Febre	11/31	35,5
Infecção	22/31	70,1
Crises de dor	22/31	70,1

O grupo de pacientes que compôs a casuística deste estudo foi avaliado quanto ao perfil de variáveis hematológicas e de moléculas relacionadas a vias metabólicas importantes no curso clínico da HbSS, como as associadas ao metabolismo lipídico, renal, hepático, à hemólise e ao processo inflamatório. Desta forma, os dados referentes às variáveis investigadas no total de pacientes HbSS em crise estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características demográficas e laboratoriais exibidas pelos indivíduos HbSS em crise avaliados neste estudo.

Características	N	Média ± Desvio Padrão	Percentil (25%)	Mediana	Percentil (75%)
Idade, anos	31	10,34±4,36	8,00	10,00	15,00
Sexo					
Masculino, N(%)	16(51,6)				
Feminino, N(%)	15(48,4)				
Dados Hematológicos					
Hemácias milhões/mL	26	2,58±0,75	2,00	2,50	3,00
Hemoglobina g/dL	31	8,47±2,04	7,20	8,20	10,00
Hematócrito %	29	25,91±5,21	22,20	25,70	30,20
VCM fL	25	83,62±8,46	78,70	82,40	88,70
HCM pg	25	25,80±3,18	25,20	28,50	30,40
CHCM g/dL	25	33,35±1,65	32,30	33,00	34,35
Reticulócitos %	12	2,52±1,33	1,30	2,70	4,00
Leucócitos x10 ⁹ /L	25	15.062,40±8.006,78	10.400,00	15.200,00	20.450,00
Segmentados x10 ⁹ /L	22	9.512,57±6.516,06	5.386,00	8.087,00	11.838,00
Bastão x10 ⁹ /L	23	2,04±1,58	92,00	190,00	573,50
Eosinófilos x10 ⁹ /L	21	620,29±552,82	254,00	464,00	10.064,00
Basófilos x10 ⁹ /L	5	61,60±56,27	0	26,36	143,00
Linfócitos x10 ⁹ /L	22	4.812,90±3.622,66	2.551,00	3.952,00	6.699,00
Monócitos x10 ⁹ /L	22	485,64±341,85	171,75	458,50	683,75
Plaquetas x10 ⁹ /L	30	360,57±185,89	220,00	356,00	457,25
Perfil Bioquímico					
Colesterol Total mg/dL	29	134,10±26,67	114,00	130,00	147,00
HDL-colesterol mg/dL	31	32,19±7,30	26,00	33,00	38,00
LDL-colesterol mg/dL	31	80,26±23,81	64,00	77,00	89,00
VLDL-colesterol mg/dL	31	20,42±9,97	14,00	19,00	24,00
Triglicérides mg/dL	31	102,26±49,76	70,00	95,00	119,00
LDH U/L	29	751,31±356,36	515,00	659,00	951,50
BILT mg/dL	29	1,0±0,55	0,55	0,90	1,20
BILD mg/dL	30	0,42±0,41	0,20	0,30	0,50
BILI mg/dL	29	0,71±0,61	0,30	0,60	0,90
AST U/L	31	47,71±29,97	28,00	39,00	51,00
ALT U/L	29	27,86±20,19	13,00	20,00	40,00
Albumina mg/dL	29	4,28±0,37	4,10	4,30	4,60
Uréia mg/dL	28	21,54±6,22	17,00	23,00	25,00
Creatinina mg/dL	28	0,45±0,17	0,32	0,43	0,53
Ácido úrico mg/dL	31	3,08±1,18	1,90	3,10	4,00
Creatina Kinase	29	62,41±45,50	32,50	48,00	79,50
Sódio mEq/L	24	139,29±2,99	137,00	140,00	141,00
Potássio mEq/L	24	4,32±1,24	3,73	4,10	4,40

Foi avaliada a correlação entre as variáveis hematológicas, bioquímicas, citocinas e de moléculas de adesão e de superfície nos pacientes HbSS em crise, com a finalidade de avaliar a influência de uma variável na elevação ou diminuição de outro parâmetro estudado. Na **Figura 3** (A-H) são apresentados os gráficos com correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre dois parâmetros distintos, indicando assim o efeito positivo e/ou negativo que uma variável exerce sobre a outra, podendo ser observado pelo valor de r (coeficiente de correlação), em indivíduos HbSS durante a crise. É possível observar que o aumento de Hb (**Figura 3B**) e de linfócitos (**Figura 3D**) esteve relacionado positivamente com a elevação dos níveis de VCAM-1s, onde

estes dois parâmetros hematológicos exercem efeito positivo nessa variável, apresentando valor de coeficiente de correlação de $r=0,432$ e de $r=0,452$, respectivamente. Por outro lado, os marcadores de superfície, CD32 em monócitos não estimulado por LPS (**Figura 3E**) e CD62L em monócitos estimulados por LPS (**Figura 3F**), apresentaram correlação negativa estatisticamente significativa ($p<0,05$) para a variável contagem de plaquetas, ou seja, quanto maior essa variável hematológica nos indivíduos HbSS em crise, menores foram os valores para os marcadores de superfície CD32 e CD62L. Este comportamento também pode ser verificado nos valores de coeficiente de correlação expressos nos gráficos para o CD32 ($r=-0,596$) e para o CD62L ($r=-0,680$) com correlação negativa significativa ($p<0,05$) para a variável plaqueta. A figura 3G mostra a correlação positiva estatisticamente significativa entre o sódio e plaquetas ($r=0,442$ e $p=0,031$).

O gráfico que correlaciona a citocina IL-12 e Hb (**Figura 3H**) apresenta valor de $r=-0,390$, indicando que quanto maior a Hb menor a IL-12 nesses indivíduos.

A **Tabela 3** mostra a comparação dos dados hematológicos, bioquímicos, perfil inflamatório, marcadores hemolíticos e moléculas de adesão nos indivíduos HbSS no estado estável e em crise avaliados neste estudo. A partir dos valores determinados para os marcadores hemolíticos foi possível observar que os pacientes em crise apresentaram níveis mais elevados para a AST e LDH quando comparados aos pacientes HbSS no estado estável. Em relação ao metabolismo lipídico, constatou-se que os níveis de colesterol total, HDL-c e LDL-c foram menores nos pacientes HbSS em crise. Quando avaliado o perfil inflamatório, com exceção do ácido úrico e IL-12, todas as citocinas investigadas estiveram aumentadas nos pacientes HbSS em crise em relação aos pacientes estáveis.

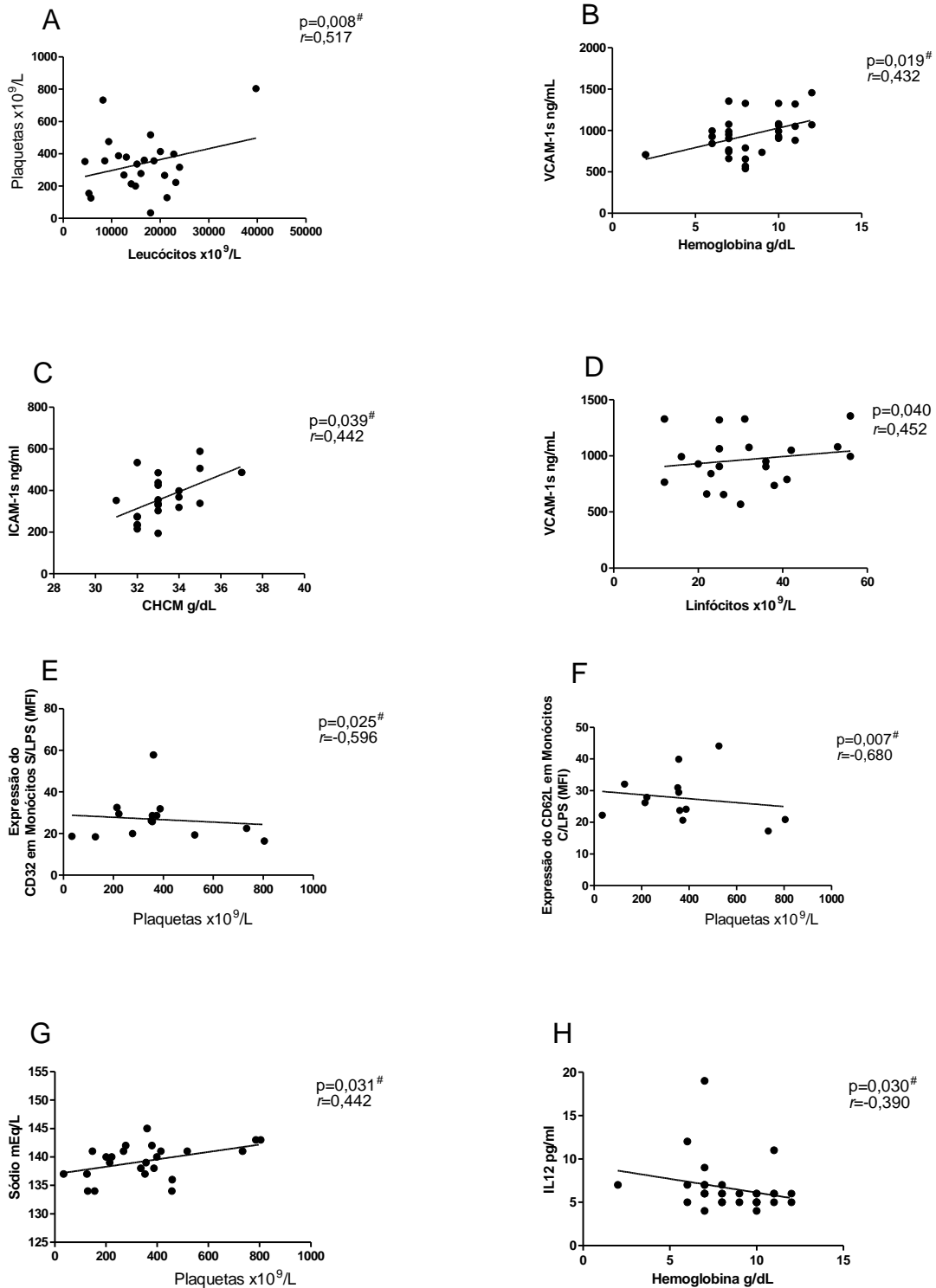


Figura 3. Demonstração gráfica da correlação entre as variáveis hematológicas, bioquímicas, citocinas e de moléculas de adesão e de superfície em pacientes HbSS em crise. (A) Correlação positiva entre plaquetas e leucócitos; (B) Correlação positiva entre VCAM-1s e hemoglobina; (C) Correlação positiva entre ICAM-1s e CHCM; (D) Correlação positiva entre VCAM-1s e linfócitos; (E) Correlação negativa entre CD32 e plaquetas; (F) Correlação negativa entre CD62L e plaquetas; (G) Correlação positiva entre

sódio e plaquetas; e (H) Correlação negativa entre IL-12 e hemoglobina. # Coeficiente de Correlação de Pearson, ## Coeficiente de Correlação de Spearman.

Tabela 3. Comparação dos indivíduos HbSS no estado estável e em crise avaliados neste estudo.

	Estado estável HbSS Média (DP)	Estado de crise HbSS Média (DP)	Valor de P ^φ
Idade (anos)	16,00±13,99	10,00±4,36	-
Gênero			-
Masculino	21/45±46,70	16/31±51,60	-
Feminino	24/45±53,30	15/31±48,40	-
Dados Hematológicos			
Hemoglobina (g/dL)	8,09±1,60	8,46±2,04	0,377*
Volume celular médio VCM (fL)	91,06±9,02	83,52±8,46	0,001*
Leucócitos (x 10 ⁹ /L)	11802,56±3635,57	15782,40±7581,22	0,004*
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	373224,44±183404,31	360566,67±185889,04	0,858
Marcadores hemolíticos			
AST (U/L)	32,78±14,84	47,71±29,97	0,006
LDH (U/L)	720,97±257,09	751,31±356,35	0,672*
Metabolismo lipídico			
Colesterol Total (mg/dL)	158,53±43,18	132,03±26,98	0,004
HDL-C (mg/dL)	42,93±9,84	32,19±7,29	0,0001
LDL-C (mg/dL)	87,48±47,39	80,25±23,80	0,437*
Perfil inflamatório			
IL-1b (pg/mL)	8,13±3,23	16,11±9,94	0,0001
IL-6 (pg/mL)	10,39±6,66	22,39±14,64	0,0001
IL-12 (pg/mL)	10,07±6,48	6,40±2,98	0,0001
TNF-α (pg/mL)	7,18±2,00	19,03±18,46	0,0001
IL-10 (pg/mL)	8,87±1,52	17,75±9,57	0,0001
Ácido úrico (mg/dL)	4,40±2,02	3,08±1,17	0,001
Moléculas de adesão solúvel			
ICAM-1s (ng/mL)	380,01±118,04	367,27±118,04	0,626*
VCAM-1s (ng/mL)	666,79±397,19	948,06±245,08	0,001*

*Test T independente

^φ teste Mann-Whitney

A **Figura 4** mostra a associação entre os níveis séricos de TNF-α, VCAM-1s, IL-1β, IL-10 e IL-12 de 45 pacientes HbSS no estado estável (**Figura 4 A, C, E e G**) e 31 pacientes HbSS em crise (**Figura 4 B, D, F e H**).

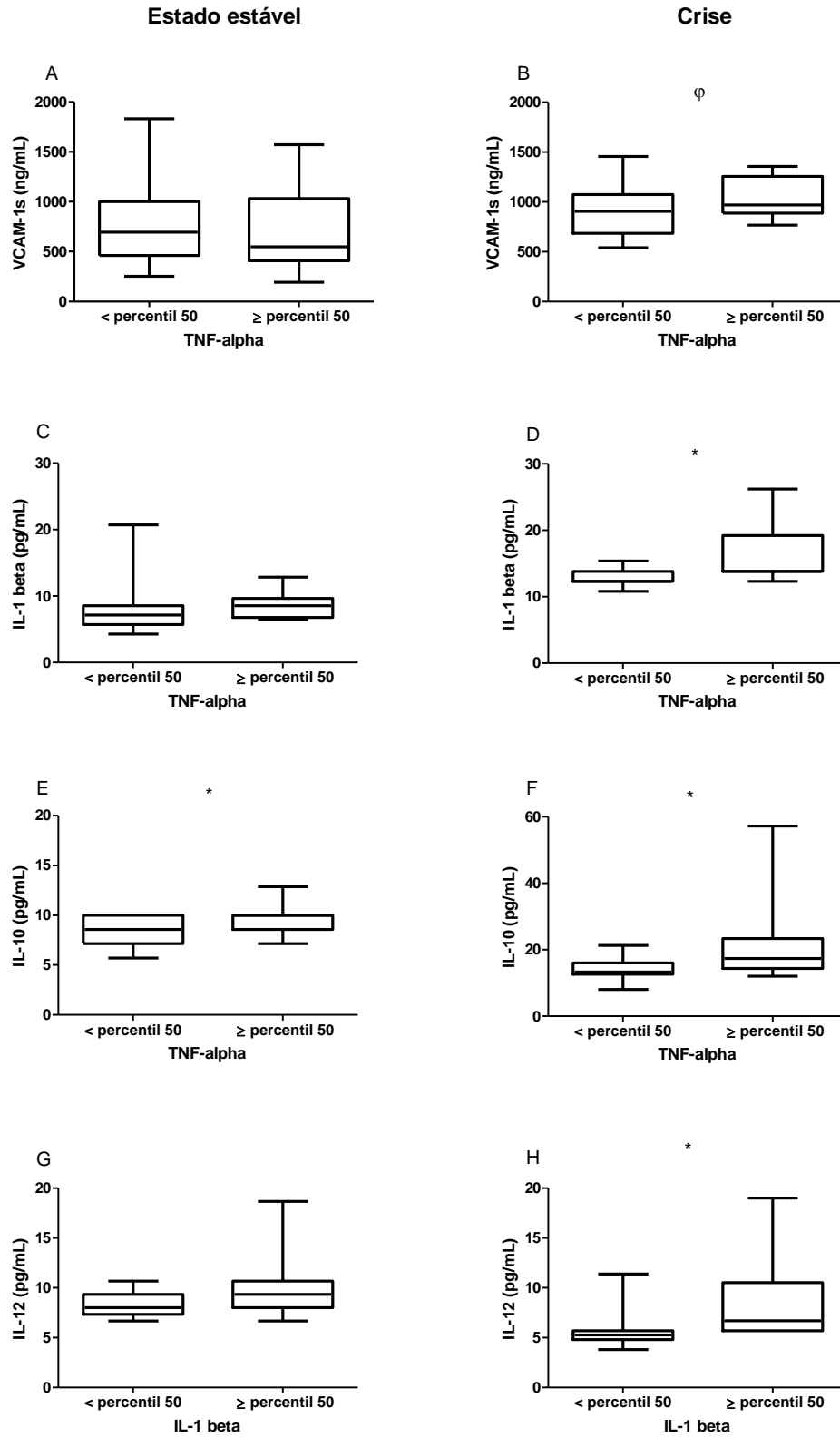


Figura 4. Associação entre os níveis séricos de TNF- α , VCAM-1s, IL-1beta, IL-10 e IL-12 de 45 pacientes HbSS no estado estável (A, C, E e G) e 31 pacientes HbSS em crise (B, D, F e H). * teste Mann-Whitney, $p < 0.05$; ϕ Teste T independente, $p < 0.05$.

A partir da análise comparativa entre os pacientes HbSS estáveis e em crise, foi possível constatar que os níveis da citocina TNF- α estão associados a elevação dos níveis de VCAM-1s (**Figura 4 A e B**), IL-1 β (**Figura 4 C e D**) e IL-10 (**Figura 4 E e F**) nos pacientes em crise, fato evidenciado pela análise dos grupos com percentil ≥ 50 nos pacientes em questão. O mesmo pode ser observado quando avaliada a influência de IL-1 β na elevação dos níveis de IL-12 nos pacientes em crise quando comparado aos pacientes estáveis.

A **Figura 5** mostra a comparação entre os níveis séricos de IL-1 β e as frações do colesterol, bem como a correlação entre IL-1 β , HDL-c, e LDL-c de 45 pacientes HbSS no estado estável (**Figura 5A**) e 31 pacientes HbSS em crise (**Figura 5B**), utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. A partir dos resultados encontrados constatou-se que no grupo de pacientes no estado estável da doença, não houve correlação entre a citocina IL-1 β e o LDL-c ($r=-0,074$) e HDL-c ($r=-0,073$).

A avaliação da correlação entre a citocina IL-1 β foi estatisticamente negativa para a fração de HDL-c ($r=-0,568$) no grupo de pacientes em crise (**Figura 5B**). Entretanto, observou-se uma correlação positiva entre a IL-1 β e a fração de LDL-c ($r=0,450$) nos pacientes HbSS (**Figura 5B**).

A **Figura 6** (A-H) mostra os gráficos que representam correlações estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as variáveis bioquímicas (ácido úrico, triglicérides, albumina e LDH), citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12) e molécula de adesão solúvel (VCAM-1s) em pacientes HbSS em crise avaliados neste estudo. Quando avaliado o parâmetro bioquímico albumina nota-se a correlação negativa com as citocinas TNF- α (**Figura 6E**), IL-10 (**Figura 6G**) e IL-6 (**Figura 6H**). Foi verificado também a correlação negativa entre o parâmetro bioquímico HDL-c com as citocinas IL-12 (**Figura 6B**) e IL-1 β (**Figura 6C**), com $r=-0,383$ e $r=-0,646$,

respectivamente. As correlações positivas foram observadas para a análise entre VCAM-1s e ácido úrico (**Figura 6A**) e entre triglicérides e IL-6 (**Figura 6D**).

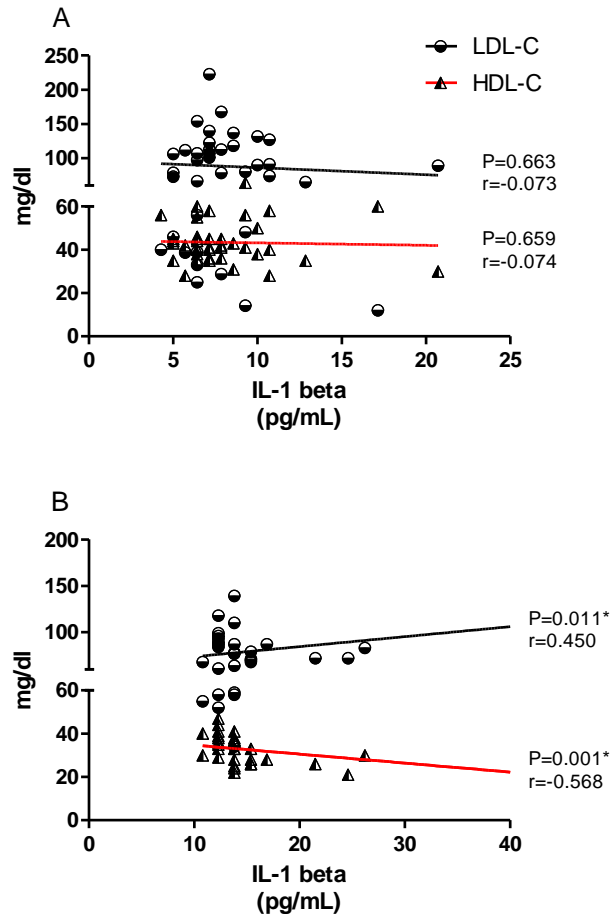


Figura 5. Correlação entre os níveis séricos de IL-1 β e as frações do colesterol. Correlação entre os níveis séricos de IL-1 β HDL-c e LDL-c em 45 pacientes HbSS no estado estável (A) e 31 pacientes HbSS em crise (B). Análise de correlação pelo coeficiente de correlação de Pearson.

A **Figura 7** mostra os gráficos relacionados a avaliação da influência dos parâmetros bioquímicos (triglicérides e HDL-c) e citocinas (IL-12 e IL-8) nos eventos de vaso-oclusão, na presença de infecção e durante a crise alérgica, quando avaliados 31 pacientes HbSS em crise.

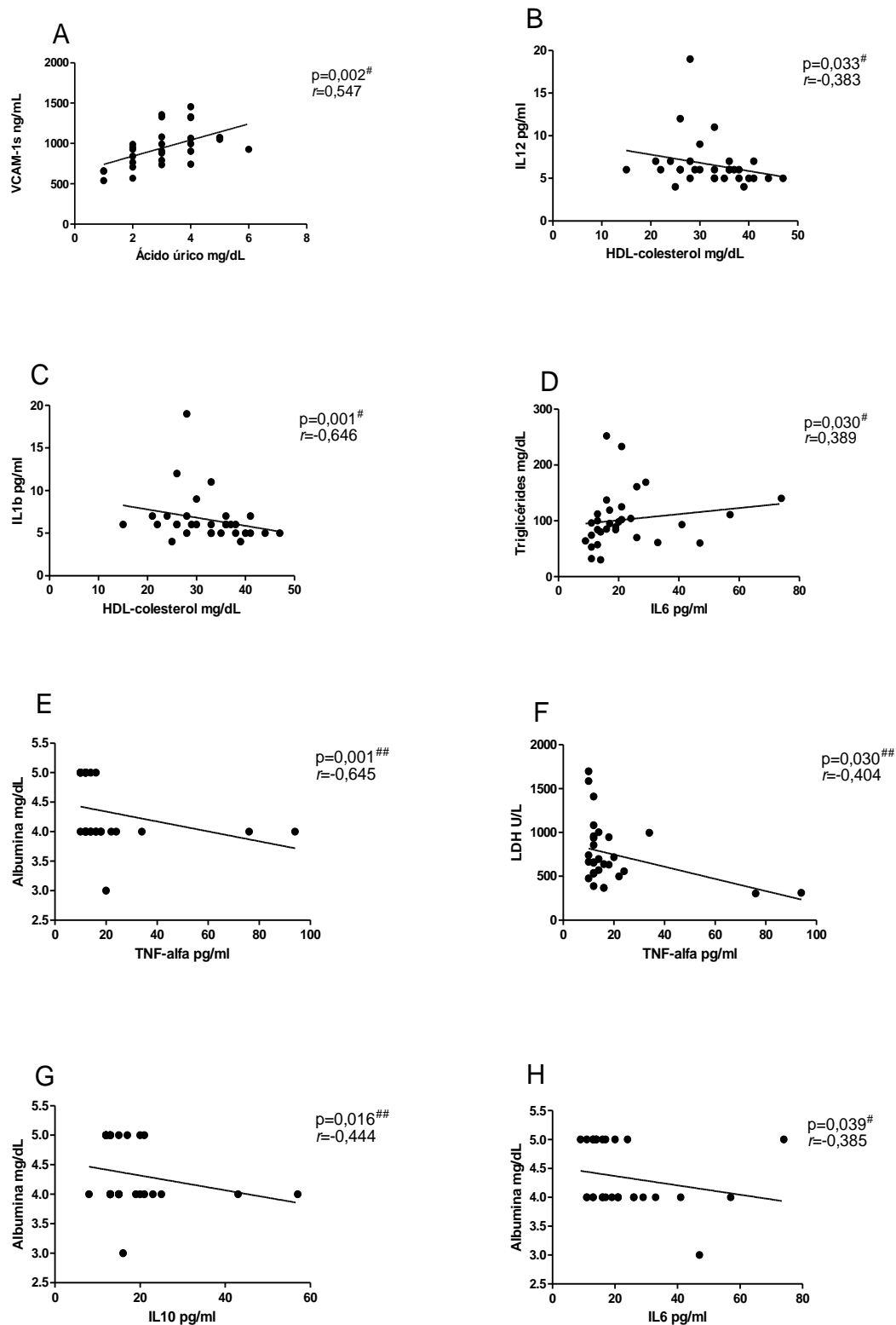


Figura 6. Demonstração gráfica da correlação entre as variáveis bioquímicas, citocinas e moléculas de adesão solúveis em pacientes HbSS em crise. (A) Correlação positiva entre VCAM-1s e ácido úrico; (B) Correlação negativa entre IL-12 e HDL-c; (C) Correlação negativa entre IL-1 β e HDL-c; (D) Correlação positiva entre triglicérides e IL-6; (E) Correlação negativa entre albumina e TNF- α ; (F) Correlação negativa entre LDH e TNF- α ; (G) Correlação negativa entre albumina e IL-10; e (H) Correlação negativa entre albumina e IL6.

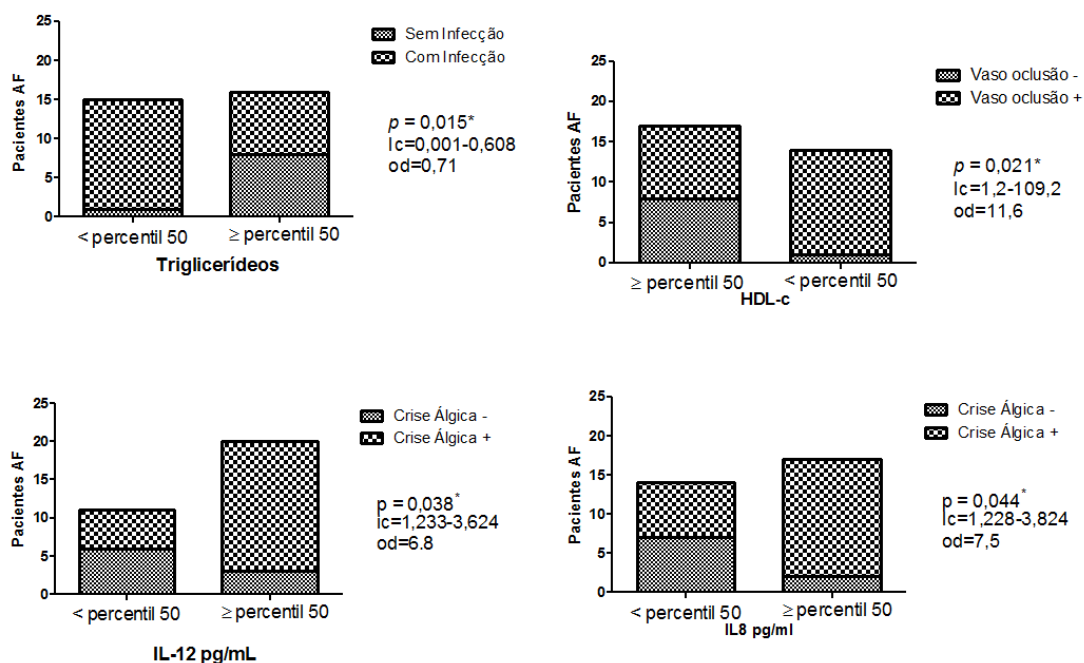


Figura 7. Avaliação da influência dos parâmetros bioquímicos (triglicérides e HDL-c) e citocinas (IL-12 e IL-8) nos eventos vaso-oclusivos, infecção e crise álgica em 31 pacientes HbSS em crise. * Teste Exato de Fisher.

Constatou-se que os pacientes HbSS que tiveram um percentil < 50 para os níveis de triglicérides apresentaram risco maior de desenvolver infecção. Diante disso, observa-se que o parâmetro triglicérides foi considerado neste estudo como um fator protetor para o desenvolvimento de infecção nos 31 pacientes HbSS avaliados. Em relação ao parâmetro HDL-c foi verificado que os pacientes que apresentaram níveis menores do que a média (percentil < 50) tiveram risco de 11,6 vezes maior de desenvolver vaso-oclusão, quando comparado aos pacientes que apresentaram níveis maiores do que a média (percentil > 50). Foi verificado também que os pacientes HbSS que apresentaram níveis \geq que a média (percentil \geq 50) das citocinas IL-12 e IL-8 tiveram risco maior para o desenvolvimento de crise álgica.

7. DISCUSSÃO

Os pacientes HbSS cursam com anemia do tipo normocítica/normocrômica, valores de hemoglobina variando de 6,5 a 10g/dL e com reticulocitose (SMELTZER *et al.*, 1998; CÉSAR, 1998; SILVEIRA & FONSECA, 2002; IVO & CARVALHO, 2003; SILVA & MARQUES, 2007). Os pacientes avaliados neste estudo apresentaram valores médios de hemácias de $2,58 \pm 0,75$ milhões/mL e de hemoglobina de $8,47 \pm 2,04$ g/dL, sendo estes índices hematológicos compatíveis com o estado de crise na HbSS. O mesmo pôde ser observado para os parâmetros bioquímicos, ou seja, os pacientes apresentaram o perfil clássico associado à HbSS, com a presença de marcadores de hemólise em concentrações elevadas. Dentre estes, pode-se destacar os valores elevados de LDH, avaliado em uma amostra de 29 pacientes (29/31) (**Tabela 2**).

A HbSS é caracterizada por quadro inflamatório crônico, apresentando contagem elevada de leucócitos, ativação anormal de granulócitos neutrófilos, monócitos e células endoteliais e elevação nos níveis de mediadores inflamatórios (TURHAN *et al.*, 2002). A adesão de leucócitos ao endotélio pode, por si só, promover o evento de vaso-oclusão (TURHAN *et al.*, 2002). Esses leucócitos aderentes podem ser responsáveis pela ligação a moléculas na superfície dos eritrócitos e, posteriormente, pela retenção destes no vaso, sugerindo associação direta e indireta no processo vaso-oclusivo (TURHAN *et al.*, 2002). Ressalta-se ainda que quando realizada a análise comparativa entre os pacientes HbSS no estado estável e no estado de crise constatou-se a elevação na contagem de leucócitos nos pacientes em crise (**Tabela 3**). A elevação no número de leucócitos tem sido invariavelmente relacionada à presença dos eventos vaso-oclusivos nos pacientes HbSS, fato que foi evidenciado nos pacientes avaliados, uma vez que estes apresentaram a frequência de 70,1% para esta alteração clínica (**Tabela 1**). Os leucócitos, eritrócitos e plaquetas contribuem para o processo vaso-

oclusivo que ocorre na microcirculação pela adesão celular ao endotélio vascular e contato célula-célula, causando uma barreira física para o fluxo sanguíneo, contribuindo para o estímulo inflamatório crônico, sendo que as moléculas de adesão celular e o endotélio são elementos chaves nesses mecanismos (OKPALA, 2004). Os ligantes endoteliais mais comuns na AF certamente estão relacionados às moléculas de adesão ICAM-1s e VCAM-1s (MORRIS *et al.*, 2005). Santos (2011) encontrou como principais características clínicas as internações (95,3%) e as crises vaso-oclusivas (74,4%) quando avaliou 43 indivíduos com HbSS no estado estável. Portanto, independente do estado do paciente HbSS, os fenômenos vaso-oclusivos são frequentes, principalmente devido a elevação no número de leucócitos e de outros mediadores inflamatórios.

IVO & CARVALHO (2003) investigaram os episódios de dor em pacientes HbSS, e evidenciaram que a crise de dor manifestava-se, inicialmente, na região óssea, como articulações, o abdômen e parte inferior das costas. Neste estudo, 70,1% dos pacientes avaliados apresentaram manifestações de dor (crise álgica) durante o estado de crise (**Tabela 1**).

A expressão de citocinas pode ter papel fundamental no quadro clínico apresentado pelos pacientes HbSS e os efeitos dessas citocinas sobre o endotélio vascular e expressão de moléculas de adesão têm sido considerados importantes na patogênese da doença (HEBBEL *et al.*, 2004; OKPALA, 2004). Os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-8 estão aumentados em pacientes HbSS quando comparados a controles saudáveis, sendo que pacientes com características clínicas mais graves apresentam concentrações séricas ainda maiores dessas citocinas (LANARO *et al.*, 2009; DWORKIS *et al.*, 2011). O TNF- α e a IL-8 são de grande interesse porque seus efeitos podem diminuir o fluxo sanguíneo e impedir a

recuperação do episódio isquêmico por aumentar a adesão da hemácia falcizada ao endotélio. Este achado é consistente com dados de estudos anteriores, os quais têm concluído que a persistência do processo inflamatório em pacientes com dor e DF é influenciada por estas moléculas (MICHAELS, 1998). No presente estudo, quando se comparou os níveis e a influência da citocina TNF- α em pacientes HbSS em crise e no estado estável, constatou-se que esta é considerada fator responsável pela elevação dos níveis de VCAM-1s, IL-1 β e IL-10 no grupo de pacientes em crise (**Figura 4**). Neste estudo observou-se o aumento nos níveis de VCAM-1s, IL-1 β e IL-10, além de outras citocinas inflamatórias, nos pacientes HbSS no estado em crise, quando se comparou estes resultados com os obtidos no grupo HbSS em estado estável.

No estudo realizado por Gonçalves e cols (2001) foi verificado que níveis circulantes elevados de IL-8 têm sido detectados em pacientes HbSS no estado em crise, ou quando estes apresentam alguma síndrome aguda. Os autores demonstraram que os níveis séricos de IL-8 foram mais elevados nos pacientes HbSS em crise quando comparados aos obtidos em indivíduos controles saudáveis. Ressalta-se que os níveis elevados de IL-8 durante a crise de dor nos indivíduos HbSS têm sido relatados independentemente do fator indutor da crise (DUITS *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo quando se investigou os níveis de IL-8 nos pacientes HbSS em crise, sendo que aqueles com percentil ≥ 50 apresentaram risco de 7,5 vezes maior para desenvolver crise álgica (**Figura 7**) quando comparados com os pacientes que tinham os níveis de IL-8 menores que a média (percentil < 50), confirmando que esta citocina está relacionada aos processos dolorosos nos pacientes HbSS. O mesmo comportamento foi observado quando avaliados os níveis de IL-12 e sua associação com as crises álgicas (**Figura 7**).

A HDL-c tem sido associada como marcador de prognóstico da hemólise intravascular e disfunção endotelial, devido as suas atividades anti-inflamatória, antioxidativa, anti-agregante, anticoagulantes e pró-fibrinolítica (NOFER *et al.*, 2002; FREDENRICH & BAYER, 2003). No estudo realizado por SEIXAS e cols (2010) foi verificado que pacientes HbSS com níveis séricos elevados de HDL-c apresentaram menos hemólise e disfunção endotelial, incluindo também contagem diminuída de reticulócitos e eritroblastos, bem como concentrações menores de HbS. Tais resultados podem ser justificados pelo aumento no consumo de colesterol pela medula, diante da necessidade de aceleração da produção de células sanguíneas durante a crise hemolítica (NOFER *et al.*, 2002; FREDENRICH & BAYER, 2003). Foi verificado também pelos autores que os pacientes HbSS que apresentaram níveis elevados de HDL-c possuíram contagem inferior de leucócitos, monócitos e plaquetas, bem como menor concentração sérica de marcadores associados a disfunção hepática e a hemólise e, com valores significativamente menores de VLDL-c e triglicérides, o que pode refletir na ação anti-inflamatória e anti-oxidante deste biomarcador (NOFER *et al.*, 2002; FREDENRICH & BAYER, 2003).

Em relação as concentrações de HDL-c nos pacientes HbSS avaliados neste estudo, constatou-se que os pacientes que apresentaram os níveis desse biomarcador abaixo da média (percentil <50) tiveram o risco 11,6 vezes maior de desenvolver eventos vaso-oclusivos (**Figura 7**). Os resultados determinados neste estudo são consistentes com os encontrados na literatura (NOFER *et al.*, 2002; FREDENRICH & BAYER, 2003; SEIXAS *et al.*, 2010). Os pacientes HbSS que apresentaram níveis de triglicérides superiores à média (percentil \geq 50) tiveram risco menor de desenvolver processos infecciosos (**Figura 7**).

O grau de ativação das células endoteliais e risco para eventos vaso-oclusivos podem ser mensurados pela concentração de moléculas solúveis, como a VCAM-1s e ICAM-1s, sendo que o aumento na expressão dessas moléculas no endotélio, seguido pelo aumento das concentrações plasmáticas deve-se à exposição à citocinas pró-inflamatórias, radicais livres de oxigênio e ao grau elevado de estresse oxidativo sistêmico (DE CATERINA *et al.*, 1995; MAKIS *et al.*, 2000). Essa ativação endotelial representa risco eminente para a ocorrência de eventos vasculares e associa-se a gravidade clínica na HbSS (DWORKIS *et al.*, 2011). KLINGS e cols (2008) observaram a ativação basal do endotélio de pacientes HbSS, quando comparada com indivíduos controle saudáveis, com correlação positiva entre VCAM-1s e a hipertensão pulmonar. O perfil pró-inflamatório e o estresse oxidativo são os responsáveis pelo aumento de células endoteliais circulantes em pacientes HbSS em estado estável, com aumento no número dessas células nas crises oclusivas (SOLOVEY *et al.*, 1997), além do aumento na expressão do CD142, com a possibilidade de desencadear a cascata de coagulação (SOLOVEY *et al.*, 1998).

Diferentes estudos comprovam que as células endoteliais de pacientes HbSS possuem a expressão elevada de moléculas de adesão, como por exemplo ICAM-1s e VCAM-1s (SOLOVEY *et al.*, 1997; MATSUI *et al.*, 2002; ATAGA & KEY, 2007; STYPULKOWSKIL & MANFREDINI, 2009). Ressalta-se que a expressão dessas moléculas no endotélio vascular encontra-se em níveis elevados mesmo em pacientes HbSS no estado estável da doença (**Tabela 3**). Entretanto, verifica-se que os níveis elevados de VCAM-1s se acentuam durante o estado de crise dos pacientes HbSS. DUITTS e cols (1996) e SOLOVEY e cols (1997) verificaram a partir de dados *in vivo*, que os pacientes HbSS possuem concentrações plasmáticas elevadas de ICAM-1s e VCAM-1s. No presente estudo, constatou-se o aumento dos níveis de Hb e de linfócitos

nos pacientes HbSS em crise (**Figura 3**) e que estes aumentos estiveram associados a níveis elevados de VCAM-1s. Vale ressaltar que essa ativação crônica do endotélio parece ser responsável pela vasculopatia dos grandes e pequenos vasos (SOLOVEY *et al.*, 1997; KEY *et al.*, 1998; ATAGA & ORRINGER, 2003).

É relatado por alguns autores que as moléculas de adesão VCAM-1s e ICAM-1s são normalmente expressas em níveis diminuídos na superfície luminal das células endoteliais, sendo que a expressão dessas moléculas é mediada por diferentes estímulos biológicos, tais com a indução por citocinas inflamatórias, como por exemplo, TNF- α . A partir da análise de associação entre os níveis séricos de TNF- α e VCAM-1s, constatou-se que essa citocina é um fator responsável pela elevação sérica de VCAM-1s nos pacientes HbSS em crise avaliados neste estudo (**Figura 4**). O TNF- α é responsável por estimular a expressão do NF- κ B, permitindo a fosforilação e degradação da proteína inibitória- κ B (I κ B) e, conseqüentemente, o estímulo à expressão de ICAM-1s e VCAM-1s na superfície celular (READ *et al.*, 1994).

Consistente com os resultados encontrados nesta pesquisa, GLADWIN e cols (2003) verificaram que os pacientes HbSS que apresentaram níveis superiores a média de VCAM-1s possuem risco maior de apresentar fenômenos vaso-oclusivos, tanto no estado clinicamente estável, quanto em crise. Além disso, esses indivíduos estão mais propensos a desenvolver hipertensão pulmonar e apresentarem mortalidade precoce (GLADWIN *et al.*, 2003). Portanto, níveis de VCAM-1s maiores que a média, podem ser utilizados para identificar pacientes com risco elevado de disfunção endotelial e fenômenos de vaso-oclusão.

De acordo com KAUL e colaboradores (1996), e como descrito anteriormente, as citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α são expressas por estresse ou trauma, e estas têm papel importante na patogênese da vaso-oclusão. O TNF- α atua sobre as

células endoteliais para aumentar a expressão de ICAM-1, o qual é reconhecido pelos membros das $\beta 2$ integrinas de leucócitos. Foi relatado por BISWAS e cols (1998) que os anticorpos dirigidos contra a cadeia β desta família da integrina e contra a ICAM-1 inibiram a ligação de neutrófilos ao endotélio dos pacientes HbSS em crise, sugerindo que outras moléculas de adesão, que não as integrinas $\beta 2$, seriam responsáveis pelo aumento da adesividade dos neutrófilos de pacientes HbSS. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram níveis elevados de ICAM-1s em pacientes HbSS no estado de crise. Entretanto, quando realizada a análise comparativa entre os pacientes HbSS no estado clinicamente estável e em crise, observou-se níveis séricos de ICAM-1s mais elevados nos pacientes no estado estável (**Tabela 3**).

Os eritrócitos falciformes expressam número maior de moléculas de adesão na superfície externa da membrana celular do que em eritrócitos normais. Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, propagando o processo de vaso-oclusão. Algumas dessas moléculas, como o CD36 são expressas somente nos reticulócitos que são eritrócitos jovens, com propriedades maiores de aderência e que estão presentes em número maior nesses pacientes, onde desempenham papel importante no fenômeno vaso-oclusivo.

No presente estudo foi observada correlação positiva entre a Hb e VCAM-1s (**Figura 3**). Assim, a correlação positiva entre a Hb e LDH com VCAM-1s pode indicar envolvimento da VCAM-1s no estresse da eritropoese que é característico de pacientes HbSS (SERJEANT, 2001). A correlação positiva entre Hb, LDH e VCAM-1s pode também ser explicada pelo efeito da ativação imune direta pela presença da Hb livre (McFAUL *et al.*, 1994; HOMI *et al.*, 1997) . No entanto, como a hipóxia é um desencadeador importante da expressão de VCAM-1s, estas correlações podem também ser o resultado de hipóxia tecidual crônica, o que pode ocorrer mais rapidamente em

pacientes com níveis diminuídos de Hb a nível tecidual (SETTY & STUART, 1996 ; HOMI *et al.*, 1997).

O número de leucócitos nos pacientes HbSS em crise foi mais elevado que o exibido pelos pacientes clinicamente estáveis (**Tabela 3**). Ressalta-se que a participação dos leucócitos, como, por exemplo, os linfócitos, em doenças que cursem com alterações vasculares e eventos trombóticos são escassos na literatura. Alguns estudos que utilizam modelos animais evidenciam a participação dessas células juntamente com o INF- γ nas disfunções vasculares (YILMAZ *et al.*, 2006). Essas células apresentam-se ativadas em pacientes HbSS em crise oclusiva, com aumento na expressão de selectinas de superfície (OKPALA *et al.*, 2002).

É relatado em alguns estudos que o ácido úrico pode atuar como agente pró-oxidante em concentrações elevadas e, também possuir papel terapêutico como antioxidante (KOENIG & MEISINGER, 2008). Destaca-se que o papel do ácido úrico como molécula pró-oxidante em pacientes HbSS que apresentam estresse oxidativo exacerbado devido aos processos de hemólise (TAYLOR *et al.*, 2008), sugere uma possível contribuição negativa dessa molécula na fisiopatologia da doença, quando presente em concentrações elevadas. Vale ressaltar que essa possibilidade é confirmada quando VILAS-BOAS e cols (2010) observaram que os pacientes com concentrações plasmáticas elevadas de ácido úrico apresentaram níveis plasmáticos também elevados de VCAM-1s, que é considerado marcador de ativação endotelial, e de marcadores clássicos de hemólise, como a bilirrubina indireta e os níveis séricos de arginase. Os níveis séricos de ácido úrico correlacionam-se positivamente com citocinas pró-inflamatórias, estabelecendo objeto de futuras pesquisas, pois não está bem descrito na literatura (RUGGIERO *et al.*, 2006). AL-NAAMA e colaboradores (2000) verificaram que os níveis séricos de ácido úrico apresentam-se mais elevados nos pacientes HbSS

que nos indivíduos saudáveis; entretanto, a verdadeira contribuição dessa molécula na fisiopatologia da doença ainda permanece incerta. A partir dos resultados encontrados neste estudo, verificou-se que existe correlação positiva entre ácido úrico e VCAM-1s, ou seja, os pacientes que apresentaram concentrações séricas elevadas de ácido úrico apresentaram também níveis séricos elevados de VCAM-1s (**Figura 6**), indicando que o ácido úrico influencia negativamente as concentrações elevadas de ácido úrico na AF podendo ser decorrente da ativação do complexo *inflammasome* e de mecanismos relacionados à característica oxidativa apresentada por essa molécula (WEBB *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2011). Além disso, as concentrações plasmáticas de ácido úrico apresentam aumento linear com citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (CERQUEIRA *et al.*, 2011; LAMKANFI, 2011).

8. CONCLUSÕES

1. Pacientes HbSS que apresentaram níveis elevados de VCAM-1s apresentaram risco maior para os eventos vaso-oclusivos, tanto no estado clinicamente estável, quanto em crise, portanto, os níveis elevados de VCAM-1s podem ser utilizados para identificar pacientes com risco elevado de disfunção endotelial e vaso-oclusão;
2. Pacientes que apresentaram concentrações séricas elevadas de ácido úrico apresentaram também níveis séricos elevados de VCAM-1s, indicando uma possível participação conjunta dessas moléculas no estado inflamatório exibido por esses pacientes;
3. Os níveis da citocina TNF- α estão associados com a elevação dos níveis de VCAM-1s, IL-1 β e IL-10 nos pacientes em crise, quando comparados com os pacientes no estado estável, evidenciando assim a influência dessas citocinas no quadro inflamatório agudo apresentado por esses pacientes;
4. Os pacientes HbSS que apresentaram níveis elevados das citocinas IL12 e IL8 tiveram risco maior para o desenvolvimento de crise álgica, indicando assim que estas citocinas estão extremamente relacionadas com os processos dolorosos nestes pacientes;
5. Os pacientes HbSS em crise apresentaram níveis mais elevados para a AST e LDH quando comparados aos pacientes HbSS no estado estável, sendo que a presença elevada desses marcadores confirma o perfil hemolítico característico de pacientes com DF;
6. Os níveis de colesterol total, HDL-c e LDL-c foram menores nos pacientes HbSS em crise e quando avaliado o perfil inflamatório, com exceção do ácido úrico e IL-12, todas as citocinas investigadas estiveram aumentadas nestes pacientes;

7. O parâmetro triglicérides foi considerado neste estudo como um fator protetor para o desenvolvimento de infecção nos 31 pacientes HbSS avaliados;

8. Foi verificado que os pacientes que apresentaram níveis menores do que a média de HDL-c tiveram risco de 11,6 vezes maior de desenvolver vaso-occlusão, quando comparado aos pacientes que apresentaram níveis elevados desse marcador, evidenciando assim que o HDLc apresenta propriedades antiinflamatórias e antihemolíticas.

9. REFERÊNCIAS

- ADORNO E. V.; COUTO D. F.; NETO M. P. J.; MENEZES. F. J.; RÊGO M.; REIS G. M.; GONÇALVES S. M. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, 21: 292-296, 2005.
- AL-NAAMA L. M.; AL-SADOON E. A.; AL-SADOON T. A. Levels of uric acid, urea and creatinine in Iraqi children with sickle cell disease. **J Pak Med Assoc**, v. 50, n. 3, p. 98-102, 2000.
- AMORIM T.; PIMENTEL H.; FONTES M.I.M.M. Avaliação do Programa de Triagem Neonatal da Bahia entre 2007 – 2009 – As Lições da Doença Falciforme. **Gazeta Médica da Bahia**. v.80, n.3, p. 10-13, 2010.
- ANGASTINIOTIS, M.; MODELL, B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. **Ann N Y Acad Sci**. v.30, n.850, p.251-69, 1998.
- ANYAEGBU C.C.; OKPALA I.E.; AKEN'OVA A.Y.; SALIMONU L.S. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia. **Eur. J. Haematol**. v.60, p.267-268, 1998.
- ASLAN M.; FREEMAN B.A. REDOX - dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radic Biol Med**. v.43, p.1469-83, 2007.
- ATAGA K.I.; MOORE C.G.; HILLERY C.A.; JONES S.; WHINNA H.C.; STRAYHORN D. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. **Haematologica**. v.93(1), p. 20-6, 2008.
- ATAGA K.I.; KEY N.S. Hypercoagulability in sickle cell disease: New approaches to an old problem. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. v.91-6, 2007.

ASSIS A.; CONRAN N.; CANALLI A. A.; LORAND-METZE I.; SAAD S. T.; COSTA F. F. Effects of cytokines and chemokines on sickle cell neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haemato.**, v.113, p.130-136, 2005.

ATAGA K.I.; ORRINGER E.P. Hypercoagulability in sickle cell disease: A curious paradox. **Am J Med.** v.115, n.9, p.721-728, 2003.

AZEVEDO S. E.; ALVES P. F. A.; SILVA O. C. M.; SOUZA F. G. M.; LIMA D. M. V. M. A.; AZEVEDO C. W. 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.

BENKERROU M.; DELARCHE C.; BRAHIMI L. Hydroxyurea corrects the dysregulated. l-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. **Blood.** v.99, p.2297–2303, 2002.

BEUTLER E. The sickle cell diseases and related disorders. **McGraw-Hill.** 5^a ed. 1995.

BISWAS P.; DELFANTI F.; BERNASCONI S.; MENGOZZI M.; COTA M.; POLENTARUTTI N.; MANTOVANI A.; LAZZARIN A.; SOZZANI S.; POLI G. Interleukin-6 Induces Monocyte Chemotactic Protein-1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells and in the U937 Cell Line. **Blood.** v.91, p.258-265. 1998.

BLANN A. D.; LIP G. Y. H. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? **Atherosclerosis.** v.128, p.135-138, 1997.

BLANN A.D.; MARWAH S.; SERJEANT G.; BAREFORD D.; WRIGHT J. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. **Blood. Coag. Fibrinolysis.** v.14, p.255–9, 2003.

BROWNE P.V.; MOSHER D.F.; STEINBERG M.H.; HEBBEL R.P. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. **Am. J. Hematol.** v.51, n.4, p.296-301, 1996.

BUNN H.F.; FORGET B.G. Sickle cell disease-molecular and cellular pathogenesis; **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.** p. 453-501, 1986.

CAPPELLINI M.D. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. **Soc. Hematol. Educ. Program.** p.74-78, 2007.

CÉSAR B.F.; Perrone H.C.; Gutierrez M.T. Pediatria – diagnóstico e terapêutica. São Paulo (SP): **Robe Editorial**; p. 438-41, 1998.

CHAPMAN E.S.; SORETTE M.; HETHERINGTON E.; ZELMANOVIC D.; KLING G.; DUGAILLIEZ J. A rapid, automated flow cytometric method to measure activated degranulated platelets by density determination. **Thromb. Haemost.** v.89, p.1004-15, 2003.

CERQUEIRA B. A.V.; VILAS-BOAS W. V.; ZANETTE A. D.; REIS M. G.; GONCALVES M.S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine.** v.56, p.471-6, 2011.

CLARK B. E.; THEIN L. S. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haematol.** v.26, p.159-76, 2004.

CUMMINGS R. D. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. **Braz J Med Biol Res.** v.32, p.519-528, 1999.

DE CATERINA R.; LIBBY P.; PENG H. B.; THANNICKAL V. J.; RAJAVASHISTH T. B.; GIMBRONE M. A. JR.; SHIN W. S.; LIAO J. K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial

expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J Clin Invest.** v. 96, n. 1, p. 60-68, 1995.

DI-NUZZO D.V.; FONSECA S.F. Anemia falciforme e infecções. **J Pediatr.**, v.80, p.347-54, 2004.

DUIITS A.J.; PIETERS R.C.; SALEH A.W. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin Immunol Immunopathol.** p.81:96, 1996.

DUIITS A. J.; SCHNOG J. B.; Lard L. R.; Saleh A. W.; Rojer R. A. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. **Eur. J. Haematol.** v.61, p.302-305, 1998.

DWORKIS D. A.; KLINGS E. S.; SOLOVIEFF N.; LI G.; MILTON J. N.; HARTLEY S. W.; MELISTA E.; PARENTE J.; SEBASTIANI P.; STEINBERG M. H.; BALDWIN C. T. Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. **Am J Hematol**, v. 86, n. 2, p. 220-223, 2011.

EMBURY S.H.; HEBBEL R.P.; STEINBERG M.H.; MOHANDAS N. Pathogenesis of vasoocclusion. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. **Rav. Press.** v.36, p.703-24, 1994.

ETIENNE-JULAN. M.; BELLOY M. S.; DECASTEL M.; DOUGAPARSAD S.; RAVION S.; HARDY-DESSOURCES M. D. Childhood sickle cell crises: clinical severity, inflammatory markers and the role of interleukin 8. **Hematologica.** v.89, p.863-4, 2004.

FADLON E.; VORDERMEIER S.; PEARSON T. C. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood.** v.91,p.266–274, 1998.

FAILACE R. Hemogama: manual de interpretação. 3^a ed. Porto Alegre, **Artes Médicas Sul**. 1995.

FELIX A.A.; SOUZA H.M.; RIBEIRO S.B.F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.32, n.3, p. 203-208, 2010.

FITZGERALD D.; ROY L.; CATELLA F.; FITZGERALD G. Platelet activation in unstable coronary disease. **N. Eng. J. Med.** v.315, p.983-989, 1986.

FREDENRICH A.; BAYER P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. **Diabetes Metab.** v.29, p.201–205, 2003.

FRENETTE P.S.; ATWEH G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest.** v.117, n.4, p.850-8, 2007.

GIBSON J.S.; ELLORY J.C. Membrane transport in sickle cell disease. **Blood Cells Mol Dis.** v.28, n.3, p.303-314, 2002.

GLADWIN M.T.; KATO G.J. Hemolysis-associated hypercoagulability in sickle cell disease: the plot (and blood) thickens! **Haematol.** v.93, n.1, p.1-3, 2008.

GONÇALVES M.S.; QUEIROZ I.L.; CARDOSO S.A.; ZANETTI A.; STRAPAZONI A.C.; ADORNO E.; ALBUQUERQUE A.; SANT'ANA A.; REIS M.G.; BARRAL W. A.; BARRAL N. M. Interleucina 8 como um marcador de vaso-oclusivas em pacientes brasileiros com doença falciforme. **Braz. J. Med. Chem. Biol.** 2001.

GUMIERO A.P.S.; BRANDAO M.A.B.; PINTO E.A.L.C.; ANJOS A.C. Colelitíase no paciente pediátrico portador de doença falciforme. **Rev. Paul. Pediatr.** v.25, n.4, p. 377-381, 2007.

HAGGER D.; WOLFF S.; OWEN J.; SAMSON D. Changes in coagulation and fibrinolysis in patients with sickle cell disease compared with healthy black controls. **Blood. Coagul. Fibrinolysis.** v.6, p.93-99, 1995.

HARLAN J.M. Introduction: anti-adhesion therapy in sickle cell disease. **Blood**. v.95, p.365-367, 2000.

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

HOMI J.; LEVEE L.; HIGGS D.; THOMAS P.; SERJEANT G. Pulse oximetry in a cohort of sickle cell disease. **Clin Lab Haematol**. v. 19, p.1722, 1997.

IVO M.L.; CARVALHO E.C. Assistência de enfermagem a portadores de anemia falciforme, à luz do referencial de Roy. **Rev Latinoam Enfermagem**. v.11(2), p.192-8, 2003.

KAUL D.K.; HEBBEL R.P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **J Clin Invest**. v.106, p.411-420, 2000.

KAUL D.K.; FABRY M.E.; NAGEL R.L. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. **Blood Rev**. v.10, p.29, 1996.

KEY N.S.; SLUNGAARD A.; DANDELET L.; NELSON S.C.; MOERTEL C.; STYLES L.A. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. **Blood**. v.91, n.11, p.4216-23, 1998.

KIM H. E.; MOK W. J.; BANG D.; LEE S. E.; LEE S.; PARK K. Intercellular adhesion molecule-1 polymorphisms in Korean Patients with Behcet Disease. **J. Korean Med. Sci**. v.18, p.415-8, 2003.

KLINGS E. S.; ANTON BLAND D.; ROSENMAN D.; PRINCETON S.; ODHIAMBO A.; LI G.; BERNARD S. A.; STEINBERG M. H.; FARBER H. W. Pulmonary arterial hypertension and left-sided heart disease in sickle cell disease: clinical characteristics and association with soluble adhesion molecule expression. **Am J Hematol**, v. 83, n. 7, p. 547-553, 2008.

KOENIG W.; MEISINGER C. Uric acid, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases: fueling the common soil hypothesis? **Clin Chem.** v. 54, n. 2, p. 231-233, 2008.

KURANTSIN-MILLS J.; OFOSU F.A.; SAFA T.K.; SIEGEL R.S.; LESSIN L.S. Plasma factor VII and thrombin-antithrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients. **Br J Haematol.** v.81, n.4, p.539-44, 1992.

LAMKANFI, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 3, p. 213-220, 2011.

LANARO C.; FRANCO-PENTEADO C. F.; ALBUQUEQUE D. M.; SAAD S. T.; CONRAN N.; COSTA F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc Biol.** v. 85, n. 2, p. 235-242, 2009.

LARD L.R.; MUL F.P.; HAAS M. Neutrophil activation in sickle cell disease. **J Leukoc Biol.** v.66, p.411-415, 1999.

LUBIN B.H. Sickle cell disease and the endothelium. **N. Engl J Med.** v.337, n.22, p.1623-25, 1997.

LUM A. F.; WUN T.; STAUNTON D. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol.** v. 76, p. 126-133, 2004.

LINDMARK E.; TENNO T.; SIEGBAHN A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.20, n.10, p.2322-8, 2000.

LYRA I.M.; GONÇALVES M.S.; BRAGA J.A.; GESTEIRA M.F.; CARVALHO M.H.; SAAD S.T.O.; FIGUEIREDO M.S.; COSTA F.F. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad. Saúde Pública.** v.21, n.4, p. 1287-1290, 2005.

MANN-JILLES V.; MORRIS D.L. Quality of life of adult patients with sickle cell disease. **J Am Acad. Nurse Pract.** v.21, n.6, p.340-349, 2009.

MANKAD V. N. School problems in sickle cell disease. Mobile Comprehensive Sickle Cell Center. **University of South Alabama College of Medicine**, 1991.

MAKIS A. C.; HATZIMICHAEL E. C.; BOURANTAS K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann Hematol**, v. 79, n. 8, p. 407-413, 2000.

MATSUI N.M.; VARKI A.; EMBURY S.H. Heparin inhibits the flow adhesion of sickle red blood cells to P-selectin. **Blood.**, v.100, n.10, p.3790-6, 2002.

MICHAELS L.S.; LISA A.; OHENE-FREMPONG K.; ZHAO H.; Steven D. D. Serum levels of substance P are elevated in patients with sickle cell disease and increase further during vaso-occlusive crisis. **The American Society of Hematology**. 1998.

MCFAUL S.J.; BOWMAN P.D.; VILLA V.M.; GUTIERREZ-IBANEZ J.; JOHNSON M.; SMITH D. Hemoglobin stimulates mononuclear leukocytes to release interleukin-8 and tumour necrosis factor. **Blood.** v.84, 1994.

MCLNTYRE T.M.; PRESCOTT S.M.; ZIMMERMAN G.A. Cell-cell interactions: leucocyte-endothelial interactions. **Current Opinion in Hematology**. v.10, p.150-158, 2003.

MOHAN G.Y.H.; LIP D.; BAREFORD A.D.; BLANN N. Platelet P-selectin and platelet mass, volume and component in sickle cell disease: Relationship to genotype. **Thromb. Res.** v.117, p.623-629, 2006.

MONTES R.A.O.; ECKMAN J.R.; HSU, L.L.; WICK T.M. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: Role of shear stress in propagation of vasoocclusion. **J. Hematol.** v. 70, p. 216-227, 2002.

MORRIS C. R.; KATO G. J.; POLJAKOVIC M.; WANG X.; BLACKWELDER W. C.; SACHDEV V.; HAZEN S. L.; VICHINSKY E. P.; MORRIS S. M.; GLADWIN Jr. e M. T. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **Jama**, v.294, n.1, Jul 6, p.81- 90. 2005.

MUNCIE H.L.JR.; CAMPBELL J. Alpha and beta thalassemia. **Am Fam Physician.**, v.80, n.4, p.339-44, 2009.

MURAO M.; FERRAZ M. H. C. Traço falciforme: heterozigose para hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.29, p.223-225, 2007.

NAGEL R.L. Severity, pathobiology, epistatic effects, and genetic markers in sickle cell anemia. **Sem. Hematol.** v.28, p.180-201, 1991.

NAOUM P. C. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: **Sarvier**. 1997.

NIETERT J. P.; SILVERSTEIN D. M.; ABOUD R. M. Sickle cell anemia; epidemiologia and cost of illness. **Pharmacoeconomics.** v.20, p.357-64, 2002.

NOFER J.R.; KEHREL B.; FOBKER M.; LEVKAU B.; ASSMANN G.; VON ECKARDSTEIN A. HDL arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis.** V.161, p.1–16, 2002.

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

OKPALA, I.; DANIEL Y.; HAYNES R.; ODOEMENE D.; GOLDMAN J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. **European Journal of Haematology.** V.69, p.135–144, 2002.

PACE B.S.; ZEIN S. Understanding mechanisms of gamma-globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. **Dev Dyn.** v.235, n. 7, p. 1727-1737, 2006.

PATHARE A.; KINDI A, S.; DAAR S.; DENNISON D. Cytokines in sickle cell disease. **Taylor & Francis Healthsci.** v.8, p.329-37, 2003.

PATHARE A.; KINDI A.S.; ALNAQDY A.A.; DAAR S.; MACAULAY H.K.; DENNISON D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **J. Hematol.** v.77, p. 323-328, 2004.

PERIN C.; FILHO-CERVO E.; BECKER F.L.; BALDISSEROTTO F.M.; RAMOS G.Z.; ANTONELLO J.S.; ALEXANDRE C.O.P.; CASTRO E.C. Anemia Falciforme. **Genética e Evolução**, Porto Alegre, 2000.

PERUTZ M.F.; ROSSMANN M.G.; CULLIS A.F. *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature.** v.13, n.185 (4711), p. 416-22, 1960.

POLANOWSKA-GRABOWSKA R.; WALLACE K.; FIELD J. J.; CHEN L.; MARSHALL M. A.; FIGLER R.; GEAR A. R.; LINDEN J. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 12, p. 2392-2399, 2010.

RAMALHO A. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. **Soc Bras Genet.** v. 1, n.2, p. 160, 1986.

RAMALHO A.S.; MAGNA L.A.; PAIVA-SILVA R.B. A portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad Saúde Pública.** v. 19, p. 1195-1199, 2003.

REES D.C.; WILLIAMS T.N.; GLADWIN M.T. Sickle-cell disease. **Lancet.** v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

READ M. A.; WHITLEY M. Z.; WILLIAMS A. J.; COLLINS T. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. **J Exp Med** v. 179, n. 2, p. 503-512, 1994.

REITER, C. D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J. E.; HOGG, N.; CANNON, R. O., 3RD; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med**. v. 8, n. 12, p. 1383-1389, 2002.

ROBERTI M.R.F. et al. Avaliação da qualidade de vida em portadores de doença falciforme do Hospital das Clínicas de Goiás, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.32, n.6, p. 449-454, 2010.

ROTHER R.P.; BELL L.; HILLMEN P.; GLADWIN M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **Jama**. v.293, n.13, Apr 6, p.1653-62. 2005.

RUGGIERO C.; CHERUBINI A.; BLE A.; BOS A. J.; MAGGIO M.; DIXIT V. D.; LAURETANI F.; BANDINELLI S.; SENIN U.; FERRUCCI L. Uric acid and inflammatory markers. **Eur Heart J**, v. 27, n. 10, p. 1174-1181, 2006.

SANTOS N.J.G. Avaliação de marcadores associados à síntese de hemoglobina fetal em indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária da hemoglobina fetal. Mestrado em Patologia Experimental. **Fundação Oswaldo Cruz**, Salvador, Bahia, 2011.

SCHNOG J.B.; ROJER R.A.; MAC GILLAVRY M.R.; TEN CATE H.; BRANDJES D.P.; DUIJS A.J. Steady-state s-VCAM-1 serum levels in adults with sickle cell disease. **Ann Hematol**. v.82(2), p.109-13, 2003.

SEGEL G.B.; HALTERMAN M.W.; LICHTMAN M.A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. **J Leukoc Biol**, v.89, n.3, Mar, p.359-72. 2010.

SEIXAS M. O.; ROCHA L. C.; CARVALHO M.B.; MENEZES J.F.; LYRA I. M.; NASCIMENTO V.M.L.; D COUTO R.D. ATTA A.M. REIS M.G.; GONCALVES M.S. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. **Lipids Health.** v.9, p.91, 2010.

SERJEANT G.R. Sickle cell disease. **Oxford University Press**, New York. 2001.

SERJEANT G.R. The sickle cell disease. **Oxford, Oxford Medical Publications.** 1985.

SERJEANT G.R. Screening for sickle cell disease in Brazil. **Lancet.** v. 356, p. 168-169, 2000.

SETTY B.N.; CHEN D.; O'NEAL P.; LITTRELL, J.B.; GROSSMAN M.H.; STUART M.J. Eicosanoids in sickle cell disease: potential relevance of 12(S)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid to the pathophysiology of vaso-occlusion. **J. Lab. Clin. Med.** v.131, p.344-53, 1991.

SETTY B.N.Y.; STUART M.J. Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. **Blood.** 1996.

SILVA W.S.L.A.; OLIVEIRA S.F.; KLAUTAU-GUIMARÃES N.; GRISOLIA C.K. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano. **Cad. Saúde Pública.** v. 22, n., p. 2561-2566, 2006.

SILVA D.G.; MARQUES I.R. Intervenções de enfermagem durante crises algicas em portadores de Anemia Falciforme. **Rev Bras Enferm.** v.60(3), p.327-30, 2007.

SMELTZER S.C.; BARE B.G. Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. **Guanabara Koogan.** 8ª ed. Rio de Janeiro. 1998.

SILVEIRA M.M.; FONSECA L.M. A complexa fisiopatologia dos episódios vaso-oclusivos na anemia falciforme. **Rev Ciên Farm.** v.23(1), p.25-46, 2002.

SOLOVEY A.; LIN Y.; BROWNE P.; CHOONG S.; WAYNER E.; HEBBEL R. P. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N Engl J Med.** v. 337, n. 22, p. 1584-1590, 1997.

SOLOVEY A.; GUI L.; KEY N. S.; HEBBEL R. P. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. **J Clin Invest.** v. 101, n. 9, p. 1899-1904, 1998.

SONATI F.; COSTA F.F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria,** v.84, n.4, 60-68, 2008.

STEINBERG, M.H. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Hemoglobin.** v.25, n.2, p.195-211, 2001.

STEINBERG M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **ScientificWorldJournal.** v.18, n.9, p.46-67, 2009.

STEINBERG H M. Genetic modulation of sickle cell anemia. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.09, p.1-13, 1995.

STYPULKOWSKI J.B.; MANFREDINI V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 32, n. 1, 2010.

TAYLOR G. J.; TANG C. D.; SAVAGE A. S.; LEITMAN F.S.; HELLER I. S.; SERTEJEANT R. G.; RODGERS P. G.; CHANOCK J. S. Variants in the VCAM-1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. **Blood.** v.100, p.4303-4309, 2002.

TAYLOR J. G. T.; NOLAN V. G.; MENDELSON L.; KATO G. J.; GLADWIN M. T.; STEINBERG M. H. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of

vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2095, 2008.

TOMER A.; HARKER L.A.; KASEY S.; ECKMAN J.R. Thrombogenesis in sickle cell disease. **J. Lab. Clin. Med.** v.137, p.398–407, 2001.

TENAGLIA A. N.; BUDA A. J.; WILKINS. R. G.; BARRON M. K.; JEFFORDS. P. R. Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. **Am. J. Cardiol.** v.79, p.742-747, 1997.

TRENT R.J. Diagnosis of the haemoglobinopathies. **Clin Biochem Rev.** v. 27, n.1, p.27-38, 2006.

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

VILAS-BOAS W.; CERQUEIRA B. A.; ZANETTE A. M.; REIS M. G.; BARRAL-NETTO M.; GONCALVES M. S. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Ann Hematol.** v. 89, n. 9, p. 877-882, 2010.

VILAS-BOAS W. Metabolismo da arginina e moléculas associadas à ativação endotelial na anemia falciforme. **Tese de doutorado pela Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**, 2011.

WANG W. C.; LUKENS J. N. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. **W. Clin. Hemat.** p.1346-97, 1999.

WEBB R.; JEFFRIES M.; SAWALHA A. H. Uric acid directly promotes human T-cell activation. **Am J Med Sci**, v. 337, n. 1, p. 23-27, 2009.

WENZEL K.; ERNST M.; ROHDE K.; BAUMANN G.; SPEER A. DNA polymorphisms in adhesion molecule genes – a new risk factor for early atherosclerosis. **Human Genet.** v.97, p.15-20, 1996.

WESTERMAN M.P.; GREEN D.; GILMAN-SACHS A.; BEAMAN K.; FREELS S.; BOGGIO L. Coagulation changes in individual with sickle cell trait. **Am J Hematol.** v.69, n.2, p.89-94, 2002.

WUN T.; PAGLIERONI T.; TABLIN F.; WELBORN J.; NELSON K.; CHEUNG A. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell disease. **J Lab Clin Med.** v.129, n.5, 507-16, 1997.

WRIGHT J.G.; MALIA R.; COOPER P.; THOMAS P.; PRESTON F.E.; SERJEANT G.R. Protein C and protein S in homozygous sickle cell disease: does hepatic dysfunction contribute to low levels? **Br. J. Haematol.** v.98, p.627-31, 1997.

YILMAZ G.; ARUMUGAM T. V.; STOKES K. Y.; GRANGER D. N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation.** v. 113, n. 17, p. 2105-2112, 2006.

ZAGO M.A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. **Rev. Paul. Med.** v.6, p.300-304, 1986.

ZAGO M.A.; PINTO A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v.29, n.3, p.207-214, 2007.

ZENNADI R.; CHIEN A.; XU K.; BATCHVAROVA M.; TELEN M.J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood.** v.15, n.8, p.3474-3483, 2008.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____
autorizo a participação em pesquisas realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz – FIOCRUZ - BA, do menor
_____, cujo
título do trabalho está especificado a seguir.

“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RISCO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM CRISE VASO-OCCLUSIVA”

A participação do menor é totalmente voluntária e pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

O objetivo deste trabalho é investigar aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais da população atendida em nosso serviço.

Os registros da participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para a participação deste estudo não implicará na retirada de sangue adicional, de modo que será utilizada uma quantidade remanescente da mesma amostra coletada para a realização dos exames solicitados pelo médico. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir esses riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e avaliação periódica do menor.

A participação do menor no estudo não trará benefícios, mas possibilitará a obtenção de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento de indivíduos que apresentam alguma doença conhecida e na implantação de políticas de saúde.

Assinatura do responsável _____

Data ___/___/___

Nome do responsável (letra de fôrma) _____

Endereço _____

Nome Testemunha 1

RG _____

Nome Testemunha 2

RG _____

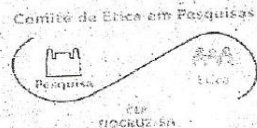
Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Dra Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia/UFBA e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

APÊNDICE B



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

PARECER Nº 205/2009

Protocolo: 306

Projeto de Pesquisa: “Estudo de Fatores Moleculares e Imunológicos no Prognóstico da Infecção e Vaso-oclusão na Anemia Falciforme”

Pesquisadora Responsável: Drª Marilda de Souza Goncalves

Instituição ou Departamento: LPBM/CPqGM-FIOCRUZ

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios semestral e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

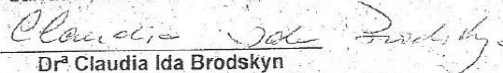
Vigência: 23/10/2009 a 23/04/2013.

Envio do Relatório Anual em: 23/10/2010 – 23/10/2011 – 23/10/2012.

Relatório Final: 23/05/2013.

The present study, entitled “Estudo de Fatores Moleculares e Imunológicos no Prognóstico da Infecção e Vaso-oclusão na Anemia Falciforme” (protocol number 306) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in October 23rd 2009 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008. In the present version, this project is licensed and valid until April 23rd 2013.

Salvador, 23 de outubro de 2009.



Drª Claudia Ida Brodskyn

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CPqGM/FIOCRUZ

IORG-0002090 / IRB-00002612

APÊNDICE C



AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RISCO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM CRISE VASO-OCCLUSIVA



Questionário Epidemiológico

- Nome: {NOME} _____ Sigla: {sig} _____ Telefone: () _____
- Endereço: _____
- Registro: {REG} _____ Nº Pront. HEMOBA: {PRON} _____ Data de Nasc.: ____/____/____
- Idade: {I} _____ Gênero: {GENER} () Masculino [0] () Feminino [1]
01. Qual a sua cor? {cor} () Branca[0] () Negra[1] () Parda[2] () Amarela[3] () Indígena[4]
02. Você estuda? {EST} () NÃO [0] () SIM [1]
03. Nível de escolaridade: {NESC} () Alfabetiz.[0] () Até 4 FM[1] () Até 8 FM[2] () Até 3 MD[3]
() Técnico [4] () Superior incompleto [5] () Superior completo [6]
04. Número de irmãos: {NIRM} () 0 [0] () 1 [1] () 2 [2] () 3 [3] () 4 ou + [4]
05. Familiares com DF? {FDFALC} () Nenhum[0] () Pai [1] () Mãe [2] () Irmão [3]
06. Idade primeira menstruação: {IPM} () Não menst.[0] () 09-11[1] () 12-14 [2] () 15-17 [3]
07. Já engravidou? {ENGRA} () NÃO [0] () SIM [1]
08. Está grávida? {GRA} () NÃO [0] () SIM [1]
09. Usa anticoncepcional? {ANTICO} () NÃO [0] () SIM [1]
10. Menstruação é regular? {MREG} () NÃO [0] () SIM [1]
11. Idade do 1º diagnóstico de Doença Falciforme: {ID} () <6 m [0] () 6m - 4anos [1] () 5 - 9anos [2]
() 10 - 14anos [3] () 15 - 17anos [4] () > 17 anos [5]
12. Eletroforese de Hb {EHB} () AA[0] () SS[1] () SC[2] () SB+[3] () SB₀[4]
() SD[5]
13. Haplótipo () Sen[0] () Car[1] () Ben[2] () Cam[3] () Sau-Ara [4]
{HAPL} () Atip[5] () I[6] () II[7] () III[8]
14. Talassemia {TAL} () Negativo[0] () Hetero 3.7[1] () Homo 3.7[2]
() Hetero 4.2[3] () Homo 4.2[4]
15. Já esteve internado? {INTER} () NÃO [0] () SIM [1]
Se SIM, quantas vezes? {QINTER} () 1 [0] () 2-5 [1] () 6-10 [2] () 11 ou + [3]
Qual especialidade? {ESPEC} () Cardiologia [0] () Oftalmologia [1] () Neurologia [2]
() Infectologia [3] () Pneumologia [4] () Cirurgia [5]
() Angiologia [6] () Nefrologia [7] () Clínica da Dor [8]
() Outras [9]
16. Já teve pneumonia? {PNEU} () NÃO [0] () SIM [1]
Se SIM, quantas vezes? {QPNEU} () 1[0] () 2-3[1] () 4-6[2] () 7 ou + [3]
Se SIM, teve febre? {FEBRE} () NÃO [0] () SIM [1]

- Anormalidade no RX? {ARX} NÃO [0] SIM [1]
- Quando internado, usou medicação? {MPNEU} NÃO [0] SIM [1]
- Quais? _____
{DESCMPNEU}
17. Teve ou tem esplenomegalia? {ESPLE} NÃO [0] SIM [1]
- Em que período? {PERIOESPLE} <6m [0] 6m-1ano [1] 2-3a [2] 4-5a [3] >6a [4]
- Teve crise de seqüestro esplênico? {SEQESPLE} NÃO [0] SIM [1]
- Se SIM, quantas vezes? {QSEQESPLE} _____
18. Faz uso profilático de Penicilina? {PROP} NÃO [0] SIM [1]
- Se SIM, qual? {QPEN} Penicilina V oral [0] Penicilina benzatina [1]
- Se Sim, há quanto tempo? {QTPEN} até 1 ano [0] + de 1 ano a 3 anos [1]
 + 3 anos a 5 anos [2] + 5 anos a 7 anos [3]
 + de 7 anos [4]
19. Já teve AVC? {AVC} NÃO [0] SIM [1]
- Se SIM, quantas vezes? {QAVC} 1 [0] 2 [1] 3 [2] 4 ou + [3]
- Se SIM, seqüelas do AVC? {SEQAVC} NÃO [0] SIM [1]
- Já fez ressonância magnética? {RESSOMAG} NÃO [0] SIM [1]
- Alguma alteração? {ALTRESSOMAG} NÃO [0] SIM [1]
20. Espectomizado? {ESPECTO} NÃO [0] SIM [1]
- Esplenectomia: {TIPOESPECTO} Total [0] Parcial [1]
21. Apresenta asma? {ASMA} NÃO [0] SIM [1]
- Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QASMA} 0 [0] 1-3 [1] 4-7 [2] 8 ou + [3]
- Faz uso regular de nebulização? {NEBU} [0] NÃO SIM [1]
22. Tem crises de dor? {CRISDOR} [0] NÃO SIM [1]
- Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QCRISDOR} 0 [0] 1-3 [1] 4-7 [2] 8 ou + [3]
- Quando foi a última crise? {ULTCRISDOR} <1 mês [0] 1-3m [1] 4m ou + [2]
- Usa medicação para a dor? {MDOR} NÃO [0] SIM [1]
- Prescrita por um médico? {PRESMDOR} NÃO [0] SIM [1]
- Assistido por especialista em dor? {ESPECODOR} NÃO [0] SIM [1]
- Faz tratamento com hidroxiúria? {HIDROXI} NÃO [0] SIM [1]
23. Faz uso de alguma medicação? {MEDIC} NÃO [0] SIM [1]
- Se SIM, qual? {DESCMEDIC} _____
- Com que frequência? {FREQMEDIC} Diário [0] Dias alternados [1] Semanal [2]
 Quinzenal [3] Mensal [4] Bimestral [5] Semestral [6]
24. Vaso-Ocusão: {VO} NÃO [0] SIM [1] Quantas vezes? {QVO} _____
- Fez uso de alguma medicação? {MVO} NÃO [0] SIM [1]
25. Retinopatia: {RETIN} NÃO [1] SIM [2]
- Se SIM, fez uso de alguma medicação? {MRETIN} NÃO [0] SIM [1]
- Faz consultas periódicas com oftalmo? {CONSOFTAL} NÃO [0] SIM [1]
26. Infecções: {INFEC} NÃO [0] SIM [1]

- Quais? {DESCINFEC} () Rinite [0] () Sinusite [1] () Otite [2]
 () Faringite [3] () Amigdalite [4] () Outros [5]
- Fez uso de alguma medicação? {MINFEC} () SIM [0] () NÃO [1]
27. Priapismo: {PRIAP} () NÃO [0] () SIM [1]
 Nº de vezes: {QPRIAP} () Até 4 [0] () 05-09 [1] () 10 ou + [2]
 Fez uso de alguma medicação? {MPRIAP} () NÃO [0] () SIM [1]
28. Úlcera maleolar: () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QULCMALEO} _____
 {ULCMALEO}
 Idade da primeira úlcera: {IDULC} () Até 4 anos [0] () 5-9 [1] () 10 ou + [2]
 Tratou a úlcera? {TRATULC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual tratamento? {QUALTRAT} _____
29. Síndrome torácica aguda: {SDTOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quantas vezes? {QSATOR} () Até 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
30. Alterações ósseas: {ALOTOSSEA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCALOTOSSEA} _____
31. Insuficiência Renal Aguda: {INSRENAG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quantas vezes? {QINSRENAG} () Até 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
32. Insuficiência Renal Crônica: {INSRENCRO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Idade diagnóstico: {IDINSRENCRO} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
33. Alterações cardíacas: {INSCARD} () NÃO [0] () SIM [1] () Nunca foi [2]
 Qual alteração? {QUALALTCA} _____
- Idade diagnóstico: {IDINSCARD} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
 Fez eletrocardiograma? {ELETRO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Fez ecocardiograma? {ECOCARD} () NÃO [0] () SIM [1]
34. Seqüestro hepático: {SEQHEP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QSEQHEP} _____
35. Insuficiência respiratória: {INSRESP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QINSRESP} _____
36. Distúrbio do sono? {DISTSONO} () NÃO [0] () SIM [1]
37. Litíase biliar: {LITIBILI} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QLITIBILI} _____
38. Cirurgia: {CIRURG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? _____
 {QUALCIRURG}
39. Se SIM, fez uso de profilaxia antibiótica? {PROFANTIB} () NÃO [0] () SIM [1]
40. Completou o calendário vacinal? {CALVAC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Fez uso das seguintes vacinas? {USOVAC} () 7 valente [0] () 23 valente [1]
 () Meningo [2] () Haemophilus [3]
41. Faz uso de hemoderivados? {HEMODER} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, quantas vezes ao ano? {QHEMODER} _____
42. Possui outra patologia? {PATOLOG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCPATOLOG} () Hipertensão [0] () Diabetes [1] () Obesidade [2] () Outras [3]
43. Você trabalha? {TRAB} () NÃO [0] () SIM [1]

- Tipo de profissão: {QTRAB} _____
- Se SIM, manipula alguma substância química? {SUBQUIM} () NÃO [0] () SIM [1]
- Qual? {QSUBQUIM} _____ Frequência ? {FREQSUBQUI} _____
- Manipula diretamente esta subst? {MANIDIRE} () NÃO [0] () SIM [1]
44. Pratica esportes? {ESPOR} () NÃO [0] () SIM [1]
45. Faz uso de bebida alcoólica? {BEBE} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, que frequência? {FREQBEBE} _____
46. Você fuma? {FUMA} () NÃO [0] () SIM [1]
- Se SIM, que frequência? {FREQFUMA} _____
47. Faz uso de alguma droga? {DROGA} () NÃO [0] () SIM [1]
- Em caso de SIM, que frequência? {FREQDROGA} _____
48. Nome do pai: _____
- Nome da mãe: _____
- Nome irmã(o): _____
50. Local de atendimento: _____