



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANEMIA FALCIFORME: POLIMORFISMOS
GÊNIOS EM MOLÉCULAS DE ADESÃO
(VCAM-1 e ICAM-1), TNF-ALFA-, IL-8 e
ALTERAÇÕES FONOTÍPICAS**

BRUNO ANTÔNIO VELOSO CERQUEIRA

Salvador - Bahia - Brasil

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

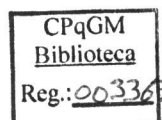
ANEMIA FALCIFORME: POLIMORFISMOS
GÊNICOS EM MOLÉCULAS DE ADESÃO
(VCAM-1 e ICAM-1), TNF-ALFA, IL-8 e
ALTERAÇÕES FONOTÍPICAS

BRUNO ANTÔNIO VELOSO CERQUEIRA

Orientadora: Dr^a Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Patologia, área de concentração
em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia
2007



Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Cerqueira, Bruno Antonio Veloso
C416p Anemia falciforme: polimorfismos gênicos em moléculas de adesão
(VCAM-1 e ICAM-1), TNF-alfa, IL-8 e alterações fenotípicas.
[manuscrito] / Bruno Antonio Veloso Cerqueira. – 2006.
99 f. : il. ; 30 cm

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia. Fundação
Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Dra. Marilda de Souza Gonçalves, Laboratório de
Patologia e Biologia Molecular.

1. Polimorfismos gênicos. 2. Moléculas de adesão. 3. Anemia
Falciforme. I. Título.

CDU 575:616.155.194(813.8)575

L12 DB1

PHL

UFBA
01/0018

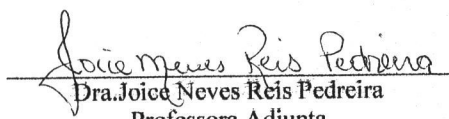
616.155.194:575(813.8)
C416p

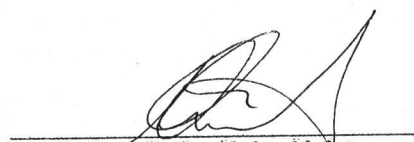
ANEMIA FALCIFORME: POLIMORFISMOS GÊNICOS EM MOLÉCULAS DE ADESÃO (VCAM-1 E ICAM-1),
TNF-ALFA, IL-8 E ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS

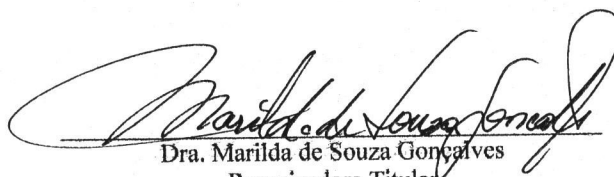
BRUNO ANTÔNIO VELOSO CERQUEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Joice Neves Reis Pedreira
Professora Adjunta
UFBA


Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara
Pesquisador Visitante
CPqGM-FIOCRUZ


Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, irmãos e a minha namorada por todo amor, carinho, paciência e atenção;
- A Professora Marilda de Souza Gonçalves, pela orientação, paciência, amizade e por todos ensinamentos transmitidos desde a graduação;
- Ao Professor Mitermayer Galvão dos Reis, pela colaboração e ensinamento como chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular;
- Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia FIOCRUZ / UFBA, pela competência e dedicação dispensadas;
- Aos colegas de equipe Cynara Barbosa, Cyntia Cajado, Cristiane Ferraz, Elder Trindade, Fábio Couto, Joelma Menezes, José Pereira, Milena Andrade, Rosane Andrade e Wendell Vilas Boas;
- A Mari Ney, Marie France, Josinete Pereira e Marivaldo Nery, funcionários do Laboratório de Pesquisas em Anemia ATGC da Faculdade de Farmácia / UFBA;
- A Rosália Silva, Hugo Gonçalves e Mário Jorge dos Anjos Dórea, funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) / FIOCRUZ;
- Aos funcionários da Biblioteca do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) / FIOCRUZ, em especial a Ana Fiscina Sampaio, pela ajuda dispensada;
- A Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), pela disponibilização dos prontuários médicos; à equipe da recepção pela organização da agenda dos pacientes e à equipe de enfermagem, pela coleta e amostras;
- A Isa Menezes Lyra, médica da HEMOBA, pela colaboração e acompanhamento dos pacientes;
- Ao Dr Bernardo Galvão de Castro, chefe do LASP (Laboratório Avançado de Saúde Pública), pelo acesso às amostras do projeto Bahia Azul;
- A todos os amigos da turma de mestrado do ano de 2005;
- Aos portadores de anemia falciforme e responsáveis, que concordaram em participar deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Hemoglobina	15
1.2 Hemoglobinopatias	17
1.3 Epidemiologia da Hemoglobina S	19
1.4 Manifestações clínicas na anemia falciforme	20
1.5 Fatores prognósticos na anemia falciforme	25
1.6 Moléculas de adesão	26
1.7 Citocinas pró-inflamatórias	28
1.8 Polimorfismos em moléculas de adesão	30
1.9 Polimorfismos em citocinas pró-inflamatórias	31
2. OBJETIVOS	33
3. JUSTIFICATIVA	34
4. CASUÍSTICA	35
5. MATERIALE MÉTODOS	36
6. RESULTADOS	46
7. DISCUSSÃO	75
8. CONCLUSÃO	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
10. ANEXOS	98
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	99

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Heterozigoto para hemoglobina S
ATP	Haplótipo atípico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BEN	Haplótipo Benin
Ca	Cálcio
CAM	Haplótipo Camarões
CAR	Haplótipo Bantu
CHCM	Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média
Cl	Cloro
Hb	Hemoglobina
Hb A1	Hemoglobina 1 do adulto
Hb A2	Hemoglobina 2 do adulto
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb S	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
Hg	Nível de hemoglobina
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
Hm	Hemácias
Ht	Hematócrito
K	Potássio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-8	Interleucina 8
LFA-1	Antígeno 1 associado a função do linfócito T
MAC-1	Antígeno macrofagico 1
Na	Sódio
NFkB	Fator de transcrição nuclear
Pb	Pares de base
Plaq	Plaquetas
SC	Duplo heterozigoto para as Hb S e C
SEN	Haplótipo Senegal
SS	Homozigoto para a Hb SS
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão à célula vascular
VCM	Volume corpuscular médio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição

LISTA DE SÍMBOLOS

α

Alfa

β

Beta

δ

Delta

ε

Epsilon

γ

Gama

ξ

Zeta

LISTA DE FIGURAS

01. Representação dos tipos de cadeias de globina presentes durante o desenvolvimento ontogênico humano e ao nascimento. Adaptado de LORENZI, 2006.
02. Localização cromossômica dos grupos de genes das globinas α e β humanas. Adaptado de LORENZI, 2006.
03. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo T-833C da VCAM-1, utilizando a endonuclease de restrição *Rsa I*.
04. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo G1238C da VCAM-1, utilizando a endonuclease de restrição *Cac8 I*.
05. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo A469G da ICAM-1, utilizando a endonuclease de restrição *BstU I*.
06. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo G-308A do TNF-alfa, utilizando a endonuclease de restrição *Nco I*.
07. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo A-251T da IL-8, utilizando a endonuclease de restrição *Ase I*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos sintéticos, tipos de enzimas de restrição e tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP realizadas para investigação dos polimorfismos gênicos.

Tabela 2- Manifestações clínicas apresentadas por 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 3- Frequência de manifestações clínicas distribuídas por faixa etária, em anos, em 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 4- Frequência de eventos de vaso-oclusão distribuídos por faixa etária, em anos, em 100 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 5- Correlação entre o número de leucócitos e manifestações clínicas na faixa etária de 2 a 5 anos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 6- Correlação entre o número de leucócitos e manifestações clínicas na faixa etária de 5 a 9 anos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 7- Correlação entre o número de leucócitos e manifestações clínicas na faixa etária de 9 a 17 anos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 8 – Correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e parâmetros hematológicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 9- Correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e a média dos eventos clínicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Tabela 10- Frequências genótípicas dos polimorfismos investigados em pacientes pediátricos com anemia falciforme e em grupo de indivíduos da população de Salvador - Bahia.

Tabela 11 - Correlação dos polimorfismos em genes de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias com aspectos fenotípicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador-Bahia.

Tabela 12- Correlação entre as médias dos eventos de vaso-oclusão, talassemia-alfa, haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S, Hb F e o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 em 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador –Bahia.

Tabela 13- Correlação entre as médias dos eventos de seqüestro esplênico, talassemia-alfa, haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S, Hb F e o polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa em 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador –Bahia.

Tabela 14- Correlação entre os polimorfismos em genes de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias com os dados hematológicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador-Bahia.

Tabela 15 – Correlação entre os polimorfismos no gene do TNF-alfa e IL-8 com os níveis séricos de TNF-alfa e IL-8 em pacientes pediátricos portadores de anemia falciforme de Salvador-Bahia.

Tabela 16 – Correlação entre os níveis séricos do TNF-alfa, IL-8 e os eventos clínicos apresentados pelos pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador-Bahia.

RESUMO

ANEMIA FALCIFORME: POLIMORFISMOS GÊNICOS EM MOLÉCULAS DE ADESÃO (VCAM-1 E ICAM-1), TNF-ALFA, IL-8 E ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS. **Introdução.** A hemoglobina S é resultado da mutação pontual A→T no sexto códon do gene beta da globina, conduzindo à substituição do ácido glutâmico pela valina na cadeia da globina beta. A anemia falciforme apresenta heterogeneidade clínica, com a gravidade variável atribuída ao pleiotropismo gênico dos pacientes. Logo, alguns pacientes apresentam alterações gênicas variadas que podem refletir na melhora ou não do fenótipo apresentado. **Objetivos.** O estudo investigou polimorfismos gênicos em moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) e citocinas (TNF-alfa e IL-8) correlacionando-os aos níveis séricos das citocinas, parâmetros hematológicos e manifestações clínicas apresentadas em um grupo de pacientes pediátricos com anemia falciforme em Salvador–Bahia. **Materiais e Métodos.** No estudo foram investigados 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme e 212 indivíduos sadios da população de Salvador. Os polimorfismos gênicos foram investigados por PCR-RFLP. Os níveis séricos das citocinas foram avaliados por ELISA. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa EPI-INFO versão 6.04 e a significância foi estabelecida para $p \leq 0,05$. **Resultados.** Do total de 125 pacientes analisados, 27 (22%) foram heterozigotos para o polimorfismo -833 na região promotora do gene da VCAM-1; 15 (12%) foram heterozigotos para o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1; 50 (40%) foram heterozigotos e oito (2%) homozigotos para o polimorfismo 469 no gene da ICAM-1; 30 (24%) foram heterozigotos e dois (2%) homozigotos para o polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa; 66(53%) foram heterozigotos e 43 (34%) homozigotos para o polimorfismo -251 na região promotora do gene da IL-8. Nossos resultados demonstraram que não houve associação estatística entre os polimorfismos -308 na região promotora do gene do TNF-alfa e -251 na região promotora do gene da IL-8 e os níveis séricos das citocinas. Além disso, nossos dados demonstraram correlação entre o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 com eventos de vaso-oclusão e entre o polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa com aumento no número de eventos de seqüestro esplênico. **Conclusão.** Portanto, nossos resultados demonstraram distribuição similar dos polimorfismos entre os pacientes pediátricos com anemia falciforme e o grupo populacional, sendo que estudos adicionais devem ser realizados visando estabelecer o papel dos polimorfismos -308 na região promotora do gene do TNF-alfa e 1238 no gene da VCAM-1 e sua associação com a expressão das moléculas e o curso das manifestações clínicas na anemia falciforme.

Palavras-chaves: Anemia falciforme; Polimorfismos gênicos; Molécula de adesão; Citocinas; Manifestações clínicas.

ABSTRACT

SICKLE CELL ANEMIA: GENIC POLYMORPHISMS IN ADHESION MOLECULE (VCAM-1 AND ICAM-1), TNF-ALFA, IL-8 AND PHENOTYPE. Introduction. Sickle cell hemoglobin results of a single nucleotide mutation A→T in the sixth codon of the beta globin gene, where a valine replaces glutamic acid in the beta globin chain. The sickle cell anemia presents heterogenic clinical manifestation, where the clinical severity varies greatly between individuals, since not all patients have identical pleiotropic genes. Some carriers have some genes background that can either ameliorate or exacerbate the phenotype. **Objective.** The study investigated gene polymorphisms in adhesion molecules and cytokines and its correlation with serum levels of the cytokines, hematological data and clinical manifestation in the pediatric patients with sickle cell anemia in Salvador-Bahia. **Materials and Methods.** Our study involved 125 pediatric patients with sickle cell anemia. In addition, we used 212 individual from a population control from Salvador. The gene polymorphisms were investigated by PCR-RFLP. The serum levels of the cytokines were measured by ELISA. The statistical analyses were conducted by EPI-INFO software version 6.04 and statistical significance was established at $p \leq 0,05$. **Results.** A total of 125 patients were analyses, of whom 27 (22%) were heterozygous to the -833 VCAM-1 polymorphism; 15 (12%) were heterozygous to the 1238 VCAM-1 polymorphism; 50 (40%) were heterozygous and eight (2%) homozygous to the 469 ICAM-1 polymorphism, 30 (24%) were heterozygous and two (2%) homozygous to the -308 TNF-alfa polymorphism; 66(53%) were heterozygous and 43 (34%) homozygous to the -251 IL-8 polymorphism. Our results demonstrated that the -308 and -251 polymorphism, respectively located at the promoter regions of the TNF-alpha and IL-8 genes weren't significantly associated with serum levels of the cytokine. Moreover, our results demonstrated correlation between the 1238 VCAM-1 polymorphism with the numbers of vaso-occlusive crisis and of the -308 TNF-alfa polymorphism with high number of spleen crisis. **Conclusions.** Hence, our data showed similar distribution of the investigated polymorphisms among pediatric patients with sickle cell anemia and the populational control group. Futhermore, additional studies should be conducted in order to investigated the role of the -308 TNF-alfa polymorphism and 1238 VCAM-1 polymorphism, their association with the molecules expression and influence in clinical course of sickle cell anemia.

Key Words: Sickle cell anemia; Gene polymorphisms; Adhesion molecule; Cytokine; Clinical manifestation.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina (Hb)

A hemoglobina é um tetrâmero composto por cadeias de globina do grupo α e do β , iguais, duas a duas, e ligadas covalentemente a um grupamento heme (CLARK; THEIN, 2004). O heme é uma molécula planar formada pela condensação de quatro núcleos pirrólicos contendo em seu centro um átomo de ferro na forma de Fe^{++} . Cada cadeia de globina tem uma bolsa onde se fixa o heme, sendo esta cavidade composta por aminoácidos hidrófobos que impedem a oxidação do ferro (ZAGO *et al.*, 2004).

A hemoglobina tem a função de transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões. A síntese de hemoglobina é diretamente controlada por genes que são ativados ou desativados em determinados estágios da vida humana, resultando em diferentes cadeias de globina (SARNAIK, 2005). Diferentes hemoglobinas foram identificadas durante o processo ontogênico humano, sendo que as hemoglobinas Gower 1 ($\xi_2 \epsilon_2$); Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) e Portland ($\xi_2 \gamma_2$) são encontradas somente nos primeiros estágios da embriogênese e a hemoglobina fetal (Hb F) predominantemente no período fetal (NAGEL; STEINBERG, 2001).

Em indivíduos adultos normais, são encontradas aproximadamente 97% da Hb A1 ($\alpha_2 \beta_2$); 1,5-3,5% Hb A2 ($\alpha_2 \delta_2$) e < 2% de Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) (NAGEL; STEINBERG, 2001; SCHNOG *et al.*, 2004). O declínio rápido da Hb F e o aumento de Hb A1, e Hb A2 ocorrem nas doze primeiras semanas após o nascimento (SCHNOG *et al.*, 2004). Isso se explica pela inter-relação do controle genético que ocorre, após o nascimento, com diminuição na expressão dos genes γ G e γ A e aumento da expressão do gene β , (figura 1) (SHAH, 2004a; LORENZI, 2006).

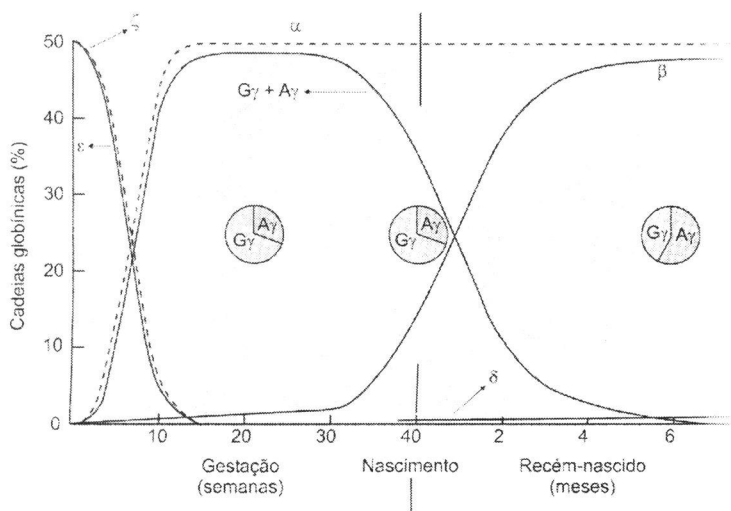


Figura 1. Representação dos tipos de cadeias de globina presentes durante o desenvolvimento ontogênico humano e ao nascimento. Adaptado de Lorenzi, 2006.

As cadeias de globina alfa são codificadas por dois genes alfa ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) localizados no braço curto do cromossomo 16, enquanto as cadeias γ , δ e β são sintetizadas respectivamente pelos genes γG e γA , δ e β localizados no braço curto do cromossomo 11 (figura 2) (CLARK; THEIN, 2004).

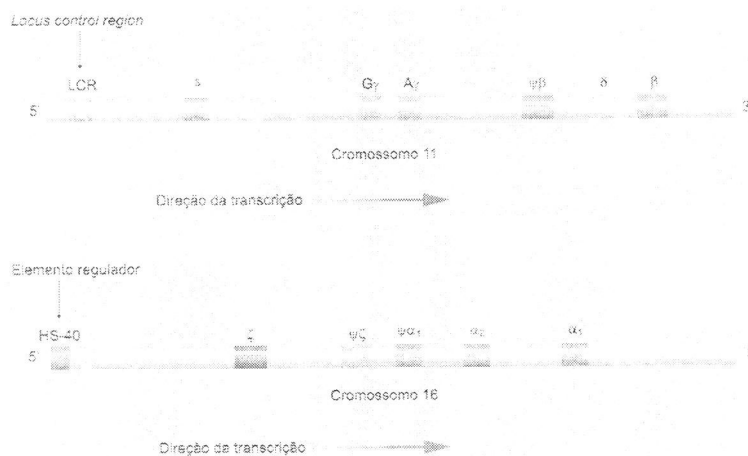


Figura 2. Localização cromossômica dos grupos de genes das globinas α e β humanas. Adaptado de Lorenzi, 2006.

1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias compreendem um grupo diverso de desordens hereditárias caracterizadas pela redução ou ausência de síntese de uma ou mais cadeias da globina (talassemias) ou a síntese de hemoglobinas estruturalmente anormais ou variantes. Essas anemias hereditárias estão distribuídas em todo mundo, possuindo prevalências elevadas em regiões tropicais e sub-tropicais (CLARK; THEIN, 2004).

A talassemia é uma desordem hereditária caracterizada por distúrbios na produção das cadeias de globina (VENTO *et al.*, 2006). As talassemias são causadas por mutações no gene da globina, com mais de 100 diferentes mutações já descritas (SARNAIK, 2005). As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia globínica cuja síntese está alterada, sendo denominadas por talassemia alfa (α), beta (β), delta (δ), gama (γ) e persistência hereditária da hemoglobina fetal, ou associação, como nas talassemias $\gamma\delta\beta$. Por serem cadeias que participam da hemoglobina A1, componente hemoglobínico mais freqüente entre os adultos, as talassemias α e β são as mais mundialmente prevalentes (LORENZI, 2006).

A hemoglobina S é uma Hb variante que possui frequência mundial elevada e resulta da substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia β da globina, sendo decorrente da mutação pontual (GAG→GTG) no sexto códon do gene da globina beta. Os portadores em homozigose para o gene da hemoglobina S (SS) possuem anemia falciforme e os portadores de apenas um gene S são denominados heterozigotos ou indivíduos AS (STEINBERG, 1995).

A solubilidade da Hb S no estado de desoxigenação é 10% menor que a da Hb A (SHAH, 2004a). Após a desoxigenação da hemoglobina S são formados, no interior dos eritrócitos, polímeros rígidos e insolúveis que deformam a superfície da hemácia através do fenômeno conhecido como falcização eritrocitária (SHAH, 2004a). Alguns fatores além da hipóxia são

desencadeadores da falcização, como acidose, infecção, desidratação, exercício intenso, frio extremo, altitude elevada, gravidez, uso de álcool e stress (NEWCOMBE, 2002). Então, na microcirculação onde o fluxo sanguíneo é lento, o trânsito celular é demorado e a tensão de oxigênio é baixa, os eritrócitos tendem a falcizar. Portanto, o aumento no número de eritrócitos falcizados gera um bloqueio na microcirculação com desencadeamento posterior de crises de dor (SHAH, 2004a). Mecanismos compensatórios, como o aumento da pressão na reperfusão, tendem a restabelecer o fluxo sanguíneo; desta forma, tanto as condições de fluxo quanto a afinidade dos eritrócitos pelo endotélio vascular são responsáveis pelos eventos de oclusão vascular (RODGERS *et al.*, 1984).

Os eritrócitos de indivíduos SS tendem a perder a deformabilidade gradativamente a partir de episódios repetidos de falcização, prejudicando a perfusão e distribuição de oxigênio para os tecidos periféricos. A redução da deformabilidade dos eritrócitos está vinculada ao aumento de viscosidade e seqüestro de eritrócitos na circulação (YEDGAR *et al.*, 2002).

Os heterozigotos AS são assintomáticos e normalmente não apresentam manifestações clínicas, podendo apresentar hematúria e redução da capacidade de concentrar a urina. Sintomas vinculados a falcização de hemácias nestes indivíduos têm sido descritos, principalmente após atividades físicas intensas, exposição a altitudes elevadas e vôos em aeronaves com cabines não pressurizadas (SARNAIK, 2005).

O termo doença falciforme é atribuído ao grupo de doenças em que a hemoglobina S está presente, sendo representado pelo estado homozigoto e a associação da hemoglobina S a alterações de síntese ou outras estruturais, como na doença SC e S Beta talassemia, entre outras (SCHNOG *et al.*, 2004). A heterozigose AS não está incluída nesse grupo pelo fato do portador não apresentar manifestações clínicas, uma vez que a maioria dos casos é assintomático (OKPALA, 2004).

A talassemia alfa envolve a diminuição ou ausência de síntese de cadeias da globina alfa, sendo resultado de deleções ou mutações nos genes $\alpha 1$ e / ou $\alpha 2$ (SHAH, 2004b). A talassemia alfa é uma das alterações genéticas mais prevalentes no mundo, com frequência de 5-10% no Oriente Médio; 20-30% no oeste da África; 68% no pacífico sul e menos de 1 % na Europa e Japão (VENTO *et al.*, 2006).

1.3 Epidemiologia da hemoglobina S

Os programas de avaliação universal de recém-nascidos têm favorecido a avaliação de várias doenças genéticas, refletindo a realidade de cada local investigado (NIETERT *et al.*, 2002). É aceito que a heterozigose e a homozigose para a Hb S são freqüentes em populações com descendência africana, mas evidências científicas demonstram que essa hemoglobina tem significância epidemiológica entre grupos populacionais da Itália, Grécia, Turquia, Arábia Saudita, Índia, Paquistão, Bangladesh, China e Cyprus (NIETERT *et al.*, 2002).

Nos Estados Unidos, estima-se que a anemia falciforme ocorra em um entre 375 a 600 nascimentos vivos entre as populações de origem africana. Na Jamaica, a incidência de homozigotos é estimada em 3 entre 1000 nascimentos (NIETERT *et al.*, 2002). A heterozigose AS é mais comum em regiões do leste, oeste e central da África, com freqüências entre 10 e 30%. Em algumas regiões são descritas freqüências de até 40% para a heterozigose AS, sendo que está frequência varia entre 0 a 5% em países do norte e sul da África (NIETERT *et al.*, 2002).

No Brasil, a frequência do gene βS varia de acordo com a região estudada. No estado de Minas Gerais é estimado que 1 entre 1250 crianças apresentem algum tipo de doença falciforme (NIETERT *et al.*, 2002). No estado de São Paulo foi observada a freqüência de 6,6% para a heterozigose AS entre os descendentes de africanos (RAMALHO, 1986). Em estudo

realizado na Bahia onde foram avaliadas 1200 crianças em idade escolar foi descrita a frequência de 7,4% para a heterozigose AS (AZEVEDO *et al.*, 1980). Na cidade de Salvador, ao ser realizada a triagem de hemoglobinas em recém-nascidos, foi descrita a frequência de 9,8% para heterozigotos AS e 0,2% para homozigotos SS (ADORNO *et al.*, 2005).

Nos Estados Unidos, a sobrevida do paciente com anemia falciforme aumentou de 14 para 45 anos no período de 1970 a 1980. Cumpre ressaltar que 20 % das mortes eram descritas nos primeiros 3 anos de vida, tendo como causa principal septicemias causadas por pneumococos (PLATT *et al.*, 1994). As diferenças atualmente descritas têm sido atribuídas aos avanços na medicina e a implementação de programas de avaliação de recém-nascidos (NIETERT *et al.*, 2002). No Brasil, no estudo realizado por Loureiro; Rozenfeld (2005) observaram que os indivíduos portadores de anemia falciforme apresentam baixa sobrevida, sendo a faixa etária crítica com maior número de mortes de 26,5 a 31.5 anos.

1.4 Manifestações clínicas na anemia falciforme

As manifestações clínicas agudas e crônicas presentes na anemia falciforme estão diretamente associadas aos fenômenos vaso-oclusivos e ao impedimento do fluxo sanguíneo, decorrentes da falcização intravascular em capilares e pequenas veias (BRUGNARA, 2003).

A concentração intracelular de Hb S é fundamental na velocidade das fases de nucleação e polimerização, com posterior falcização da hemácia; quanto maior a concentração de Hb S mais rápida será a falcização (BRUGNARA, 2003).

A expressão clínica da anemia falciforme é variável, com pacientes que sobrevivem até a sétima década de vida e pacientes com gravidade clínica marcante, apresentando danos em órgãos e morte precoce. Dessa forma, observa-se que alguns fatores descritos como de

prognóstico, entre eles a talassemia alfa e os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S têm sido associados ao curso clínico da doença (ADAMS *et al.*, 2003).

Os pacientes com anemia falciforme possuem eritrócitos densos, formados pela perda dos íons potássio (K^+), cloreto (Cl^-) e água, com aumento dos íons cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+) citoplasmáticos. Os canais de Gardos podem mediar perda significativa de K^+ e água durante a desoxigenação e falcização, quando comparados a condições normais de oxigenação e de hipóxia (BRUGNARA, 2003).

Após a desoxigenação o eritrócito tende a falcizar, mas pode retornar ao estado normal com a oxigenação; repetidos episódios de falcização tornam o eritrócito irreversivelmente falcizado (NEWCOMBE, 2002). Os eritrócitos falcizados possuem quantidades diminuídas de hemoglobina fetal (Hb F) e valores de Hb S que podem alcançar 50 g/dL; estão freqüentemente elevados no início de crise de dor e diminuídos, em número, após a crise (BRUGNARA, 2003).

A vaso-oclusão ou obstrução de vasos sanguíneos é um dos principais sintomas clínicos presentes na anemia falciforme. Isto se deve a interação de eritrócitos, leucócitos, plaquetas, proteínas plasmáticas e endotélio vascular. Estas ligações ocorrem preferencialmente nas veias pós-capilares e são amplificadas por estímulos de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, secretadas por monócitos, células endoteliais, leucócitos, dentre outras células, que estimulam tanto o recrutamento quanto a ativação endotelial (OKPALA, 2004).

A anemia está presente desde o nascimento, a criança apresenta icterícia e esplenomegalia, infartos esplênicos, anemia crônica e episódios de dor em membros inferiores e superiores e no abdômen. Dependendo do sítio de bloqueio da microcirculação, o paciente pode manifestar crises de dor em diversas áreas do corpo (SHAH, 2004a), sendo essas crises estimuladas pelos nervos simpáticos, com liberação de adrenalina (NEWCOMBE, 2002). As crises de dor são provocadas pela hipóxia tecidual causada pelo bloqueio da irrigação sanguínea local (PATHARE *et al.*, 2003). As crises de dor abdominais são referidas como

“síndrome da cinta” e são causadas por seqüestro visceral no mesentério ou circulação hepática (NEWCOMBE, 2002).

As crises vaso-oclusivas estão presentes de forma freqüente em alguns pacientes com anemia falciforme e podem ser confundidas com processos infecciosos bacterianos, devido à presença de febre na maioria dos casos, e a possibilidade de desencadeamento de processos vaso-oclusivos após infecções bacterianas (LESPRIT; LESPRIIT, 2004).

As infecções são as complicações mais comuns em indivíduos portadores de anemia falciforme. Isto se deve a esplenomegalia, seguida de atrofia e fibrose do baço, fenômeno conhecido como autoesplenectomia. Essa asplenia aumenta a suscetibilidade à infecção por organismos encapsulados como *Haemophilus influenzae* e pneumococos. As pneumonias são causadas predominantemente por pneumococcus, *Salmonella spp* e *Haemophilus influenzae*. Em infecções do sistema osteo-articular, as bactérias mais prevalentes são *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*; em infecções do trato urinário a bactéria mais prevalente é a *Escherichia coli*, sendo que as septicemias são causadas predominantemente por pneumococcus, *Salmonella spp* e *Haemophilus influenzae* (SCHNOG *et al.*, 2004). As crises aplásicas ocorrem após infecção pelo parvovirus B19, causando parada temporária na produção de eritrócitos e precipitando o quadro de anemia aguda (NEWCOMBE, 2002). O risco de infecção é de 30 a 100 vezes maior em pacientes com anemia falciforme que em indivíduos normais (SCHNOG *et al.*, 2004), estando associado a redução da função fagocítica dos neutrófilos nesses pacientes (OKPALA., 2004). Portanto, as infecções, junto com acidose, desidratação e hipóxia, intensificam as crises em pacientes com essa anemia (SCHNOG *et al.*, 2004).

As oclusões nos microcapilares da medula óssea são causadoras de isquemia tecidual associadas, freqüentemente às crises de dor, levando à hospitalização e tratamento dos pacientes em crise com analgésicos opióides. Dessa forma, observa-se que pacientes com

anemia falciforme que apresentam mais de três crises de dor por ano, possuem expectativa menor de vida do que aqueles com história de ocorrência rara destes episódios (SCHNOG *et al.*, 2004).

O prejuízo crônico no fluxo sanguíneo na anemia falciforme é a causa principal do dano degenerativo dos órgãos, enquanto que as vaso-oclusões agudas estão relacionadas ao acidente vascular cerebral (AVC); embolismo; infarto cardíaco e óbito (PATHARE *et al.*, 2003). As crises de seqüestro visceral causadas pela falcização são caracterizadas pelo acúmulo de eritrócitos no fígado, pulmões e baço, sendo menos comuns, porém fatais (NEWCOMBE, 2002).

O bloqueio da microcirculação renal pode ocasionar hematúria e incapacidade de concentração de urina, ocorrendo devido aos fenômenos de oclusão nos vasos medulares dos rins de pacientes com anemia falciforme ou heterozigotos AS, em decorrência da hipertonicidade intersticial, diminuição do pH local e tensão de oxigênio, predispondo o paciente à desidratação e complicações vaso-oclusivas subseqüentes (SCHNOG *et al.*, 2004; SHAH, 2004a).

Os episódios de infartos pulmonares estão correlacionados com a hipertensão pulmonar (SHAH, 2004a), sendo a síndrome torácica aguda a complicação mais grave de doença pulmonar, responsável por 25 % das mortes em pacientes com anemia falciforme (PATHARE *et al.*, 2003). A síndrome torácica aguda está associada com dificuldades de respiração; tosse; edema pulmonar e anemia, podendo ocorrer em resposta a infartos, seqüestros viscerais, infecções ou embolismo gorduroso pulmonar, mais comum em adultos (NEWCOMBE, 2002).

A obstrução do fluxo sanguíneo na região do pênis pode desencadear o priapismo e na cabeça do fêmur pode levar a necrose asséptica de cabeça do fêmur (SHAH, 2004a). A perda visual é descrita em 10% a 20% em pacientes com anemia falciforme e ocorre secundariamente a retinopatia progressiva que se mostra assintomática e sem complicações para o paciente,

com 20 a 60% dos casos desenvolvendo regressão de complexos vasculares após o início de retinopatia (DOWNES *et al.*, 2005). As úlceras de perna também são observadas nesses pacientes em decorrência de obstruções vasculares na parte superficial da pele, com posterior complicações bacterianas (SHAH, 2004a).

Os inchaços nos pés e nas mãos, também denominados de síndrome mão – pé ou dactilite, são freqüentes na infância até os 7 anos e podem aparecer como a primeira manifestação clínica dos portadores de anemia falciforme, caracterizando-se por infartos medulares e de camadas internas do córtex ósseo, crises de dor e deformações nas mãos e pés (LONERGAN *et al.*, 2001; SARNAIK, 2005).

Os infartos silenciosos cerebrais são as formas de danos neurológicos em crianças com anemia falciforme e são reconhecidos como uma das causas mais frequentes de problemas na escola, baixo quociente de inteligência e outras deficiências neurocognitivas (STEINBERG *et al.*, 2004). O acidente vascular cerebral (AVC) é uma complicação devastadora e ocorre em 11% dos pacientes até os 20 anos de idade (ADAMS *et al.*, 2003).

As complicações psicológicas como depressão e ansiedade são comumente causadas pelas crises de dor; incapacidade para o trabalho e limitações em atividades sociais e vêm sendo foco de estudos que objetivam não apenas aumentar a expectativa de vida, mas também dar qualidade de vida ao portador com anemia falciforme (ANIE, 2005).

Em alguns casos as hepatopatias são observadas na anemia falciforme, sendo conhecidas como colestase intra-hepática, que se caracteriza por hiperbilirrubinemia com apresentação clínica variável. As crianças com anemia falciforme apresentam uma forma mais branda de hepatopatia. Entretanto, falhas fulminantes e disfunções crônicas hepáticas podem ocorrer tanto em crianças quanto em adultos (AHN; WANG, 2005).

1.5 Fatores prognósticos na anemia falciforme

Os portadores de anemia falciforme que apresentam sintomatologia clínica mais grave têm apresentado contagem de leucócitos elevada e níveis de hemoglobina fetal abaixo de 8,2%, sendo que esta associação está diretamente ligada ao risco de morte precoce (PLATT *et al.*, 1994). Contudo, portadores de anemia falciforme que apresentam também talassemia- α 2 deleção 3.7 kb e/ou haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S como o Senegal, apresentam diminuição da quantidade de HbS com sintomatologia clínica mais branda (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Estudos mostram que a talassemia-alfa é um fator de prognóstico, aumentando o número de hemácias; a concentração de hemoglobina; redução da hemoglobina corpuscular média; do número de células densas; da hemólise; do número de reticulócitos e do VCM. Entretanto, complicações provenientes do aumento da viscosidade sanguínea como a retinopatia e eventos vaso-oclusivos no tecido ósseo se tornam mais frequentes (ADORNO *et al.*, 2004; ZAGO *et al.*, 2004).

Além disso, o haplótipo CAR está associado a níveis diminuídos de hemoglobina fetal e a prognóstico mais grave, sendo o haplótipo BEN associado a alterações fenotípicas menos graves que o haplótipo CAR e o haplótipo SEN associado à clínica mais branda (FIGUEIREDO *et al.*, 1996; GONÇALVES *et al.*, 2003). No estudo de Lira *et al.* (2005) foi observado que o haplótipo CAR está associado a risco elevado para a ocorrência de eventos de AVC em pacientes portadores com anemia falciforme.

1.6 Moléculas de adesão

As anormalidades dos eritrócitos envolvem mudanças bioquímicas na membrana e conteúdo celular, sendo que alterações estruturais e funcionais induzem predominantemente a ocorrência de eventos de vaso-oclusão (YEDGAR *et al.*, 2002).

A sintomatologia branda em alguns pacientes, evidencia que não apenas os eritrócitos, mas uma gama de fatores estão envolvidos na fisiopatologia da vaso-oclusão presente na anemia falciforme (PATHARE *et al.*, 2003).

A ICAM-1 (CD54), molécula de adesão intercelular 1, é expressa em células endoteliais e em várias outras células, apresentando expressão elevada em estados inflamatórios (KIM *et al.*, 2003). A ICAM-1 é um membro da superfamília das imunoglobulinas, tendo como ligantes o antígeno macrofágico-1 (MAC-1) e antígeno-1 associados à função do linfócito T (LFA-1) (KIN *et al.*, 2003). A ICAM-1 é uma glicoproteína de cadeia simples, que apresenta 5 domínios do tipo imunoglobulina. O domínio 1 amino-terminal contém um sítio de ligação para o LFA-1 e a conformação é influenciada pelo domínio 2, enquanto que a ligação ao MAC-1 ocorre no domínio 3 (WENZEL *et al.*, 1996). A ICAM-1 está envolvida no processo de migração e ativação de linfócitos, e sua forma solúvel liga-se ao LFA-1 e pode interferir na adesão entre células do sistema imune e seus alvos (YAMASHITA *et al.*, 2005).

A VCAM-1 (CD106), molécula de adesão à célula vascular 1, é uma imunoglobulina expressa em células endoteliais, epitélio, macrófagos e células dendríticas (OSBORN *et al.*, 1992). Sua expressão é induzida por citocinas e tem como receptor a integrina VLA-4 (antígeno de atividade tardia-4) (WENZEL *et al.*, 1996). A VCAM-1 possui duas estruturas alternativas, a maior compreende 7 domínios do tipo imunoglobulina e a menor contém 4 domínios. A ligação

da forma maior e, predominantemente, com o VLA-4 requer a presença do domínio 1 e 4, sendo o domínio 2 importante para a conformação da molécula (WENZEL *et al.*, 1996).

Atualmente foi demonstrado que os eritrócitos de portadores de anemia falciforme têm um papel principal nos processos de vaso-oclusão, sendo um componente promotor ou iniciador destes processos, ligando-se as células endoteliais vasculares via complexos de integrinas (VLA-4) (PATHARE *et al.*, 2003). Além disso, esses eritrócitos induzem o aumento significativo na expressão do gene da ICAM-1 na reperfusão (SHIU *et al.*, 2000).

Nos eritrócitos provenientes de anemia falciforme ocorre um aumento na expressão de ácido siálico; diminuição de fosfolípidios; aumento de esfingomiélin; exposição de fosfatidilserina; aumento de expressão de proteína banda 3 e presença de CD44, cujas mudanças na membrana citoplasmática estão relacionadas ao aumento de agregação, interação e ativação do endotélio vascular, além de mudanças no citoesqueleto (YEDGAR *et al.*, 2002).

A agregação entre os eritrócitos está relacionada ao aumento de viscosidade sanguínea, ativação de células endoteliais, facilidade na migração plaquetária e leucocitária e interação ao endotélio (YEDGAR *et al.*, 2002).

Os neutrófilos expressam uma variedade de moléculas de adesão, como MAC-1, LFA-1 e VLA-4, que se ligam respectivamente a ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio, sendo que o aumento na expressão e afinidade dessas moléculas é modulado por citocinas inflamatórias (ASSIS *et al.*, 2005).

Os neutrófilos de portadores de anemia falciforme em crise são mais aderentes ao endotélio que neutrófilos de indivíduos normais. Além disso, os neutrófilos são menos deformáveis e superficialmente maiores do que os eritrócitos, tendendo a aumentar e amplificar as crises vaso-oclusivas (ASSIS *et al.*, 2005). Logo, a contagem elevada de leucócitos, resultado do aumento do estímulo pelo fator estimulador de colônias granulocíticas, está

associada a um prognóstico clínico mais grave, com aumento de morbidade e mortalidade (OKPALA *et al.*, 2002).

O endotélio vascular tem um papel importante na vaso-oclusão e no dano isquêmico de órgãos relacionados a adesão de eritrócitos e leucócitos na anemia falciforme; além de danos causados pela reperfusão, o endotélio é também lesionado pela formação de sítios de trombose, hiperplasia e presença anormal de moléculas de adesão circulantes (ICAM-1 e VCAM-1), embora o papel fisiológico dessas moléculas solúveis não esteja claro (SHIU *et al.*, 2002; PATHARE *et al.*, 2003).

O aumento na expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, no plasma e em células endoteliais é em parte devido a superexpressão gênica, pela presença de sítios de ligação para o fator de transcrição nuclear NF- κ B (PATHARE *et al.*, 2003). Esse aumento de expressão é observado em células endoteliais que sofreram perfusão com eritrócitos SS (SHIU *et al.*, 2000). As alterações na modulação de moléculas de adesão endoteliais ocasionam migração e liberação inapropriada destas moléculas pelos leucócitos, bem como de peróxido de hidrogênio que causam dano tecidual, aumento das interações celulares e como consequência as crises de vaso-oclusão (PATHARE *et al.*, 2003).

1.7 Citocinas pró-inflamatórias

O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias tem sido constantemente associado as complicações e diversidades fenotípicas presentes na anemia falciforme (ETIENNE-JULAN *et al.*, 2004).

As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 8 (IL-8) estão aumentadas no soro de pacientes com anemia falciforme (PATHARE *et al.*, 2003). Desse modo é freqüentemente observado que os processos

inflamatórios, com aumento de TNF-alfa e IL-8, precedem ou estão associados às crises de dor (PATHARE *et al.*, 2003). Então, a liberação de citocinas em resposta a infecções, com ativação endotelial, tem um papel vital na fisiologia das oclusões microvasculares na anemia falciforme (PATHARE *et al.*, 2003).

A IL-8 é integrante de uma família de 13 quimiocinas humanas, sendo uma molécula pequena e ligante de heparina (HULL *et al.*, 2001). Essa quimiocina possui um caráter pró-inflamatório e é mediador primário da ativação e migração de neutrófilos para o tecido a partir do sangue periférico (HULL *et al.*, 2001), além de promover a angiogênese, angiostasia, estimular a degranulação de neutrófilos e aumentar o estresse oxidativo e a morte celular (ROSS *et al.*, 2004).

A IL-8 é produzida por leucócitos e células endoteliais lesadas presentes nos focos inflamatórios. Estimula o aumento da adesão de eritrócitos ao endotélio via VLA-4, sendo sua produção estimulada pelo TNF-alfa, liberado por monócitos ativados. Além disso, a IL-8 é um mediador potente de ativação de leucócitos, atuando como quimioatraente e aumentando o risco de crises de oclusão (PATHARE *et al.*, 2003). O aumento da IL-8 no plasma tem sido associado às crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme (ASSIS *et al.*, 2005). No estudo de Gonçalves *et al.* (2001) foram observados níveis aumentados de IL-8 em portadores de anemia falciforme quando comparados em estado estável e em crise de vaso-oclusão.

A IL-8 aumenta significativamente a expressão de MAC-1 na superfície de neutrófilos de portadores de anemia falciforme (ASSIS *et al.*, 2005). Dessa forma, os níveis elevados de IL-8, juntamente com a contagem elevada de leucócitos estão associados à gravidade clínica em portadores de anemia falciforme (ETIENNE-JULAN *et al.*, 2004).

O TNF-alfa é uma citocina pleiotrópica que induz a inflamação e a sinalização de morte celular, sendo um imunomodulador potente. Além disso, está envolvida no stress oxidativo,

obesidade, regulação negativa da óxido nítrico sintetase e é uma citocina pró-inflamatória tipo Th1, a qual é produzida por uma variedade de células do sistema imune (CHEN *et al.*, 2006).

O TNF-alfa estimula a expressão de VCAM-1 na superfície de células endoteliais, aumenta a interação de eritrócitos de pacientes com anemia falciforme ao endotélio e induz produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (WAGNER *et al.*, 2004). Além disso, aumenta a permeabilidade vascular, induz a migração de células inflamatórias e a liberação de mediadores inflamatórios, resultando em dano tecidual e colaborando com a patofisiologia da anemia falciforme (MCKIBBING *et al.*, 2000).

1.8 Polimorfismos em moléculas de adesão

O gene da ICAM-1 (CD 54) está localizado no cromossomo 19, região p13.3-13.2, tendo sido descritos os polimorfismos gênico K29M, G241R, G1838A na 3'UTR, e o polimorfismo no códon 469 do exon 6, onde ocorre a substituição adenina→guanina (AAG→GAG) ocasionando a mudança do aminoácido lisina para glutamina no domínio 5 da molécula (KIM *et al.*, 2003). A presença do polimorfismo K469E está associada com AVC isquêmico entre indivíduos italianos (POLA *et al.*, 2003), entretanto no estudo de Howell *et al.* (2005) não foi encontrada associação entre este polimorfismo e processos inflamatórios como pancreatite (HOWELL *et al.*, 2004) e endometriose (VIGANO *et al.*, 2003). Cox *et al.* 2006 não encontraram associação entre o polimorfismo K469E e o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Em outro estudo, realizado por Mcglinchey *et al.* 2004 demonstraram ausência de associação entre este polimorfismo e eventos de doença coronariana isquêmica. Contudo, Longoni *et al.* 2006 correlacionaram o alelo E no gene da ICAM-1 como fator de risco para a dissecação arterial espontânea.

O gene da VCAM-1(CD 106) está localizado no cromossomo 1, região p32-31, onde podem ser encontrados polimorfismos como o T-833C (ATG→ACT) e G1238C (GGT→GCT) na região promotora e no exon 6 respectivamente (TAYLOR *et al.*, 2002). O polimorfismo T-833C não apresentou associação estatística como fator de risco ao desenvolvimento de AVC, quando realizada comparação entre pacientes portadores de anemia falciforme e indivíduos normais, entretanto o polimorfismo G1238C foi caracterizado como fator protetor (TAYLOR *et al.*, 2002).

Os polimorfismos em moléculas de adesão estão sendo alvo de intensas pesquisas, com o objetivo de avaliar possíveis influências em doenças com componente inflamatório (YAMASHITA *et al.*, 2005).

1.9 Polimorfismos em citocinas pró-inflamatórias

O gene da IL-8 está localizado no braço longo do cromossomo 4; tendo sido identificado o polimorfismo -251, substituição A→T, na região promotora do gene (HULL *et al.*, 2001). Em estudo realizado em neutrófilos, linfócitos e monócitos estimulados com LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) foi demonstrado que a presença do alelo A está associada à expressão elevada de IL-8. Um dos mecanismos pelo qual pode ocorrer o aumento da expressão é se o alelo A for uma variante funcional que afeta diretamente a produção de IL-8 ou por ligação com fatores de transcrição ou por desequilíbrio de ligação com uma variante funcional no gene da IL-8 ou genes próximos (HULL *et al.*, 2001). Puthathu *et al.* 2006 associaram o polimorfismo A-251T na região promotora do gene da IL-8 a predisposição a asma. No estudo de Cooke *et al.* 2004 não associaram este polimorfismo com susceptibilidade a tuberculose pulmonar em população de origem africana. Além disso, o alelo A do polimorfismo -251 na região promotora foi associado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama (SNAUSSI *et al.*, 2006).

O gene do TNF-alfa está localizado no braço curto do cromossomo 6 junto a região do complexo HLA (JAE-YONG; KIN, 2004). O polimorfismo G-308A na região promotora do gene do TNF-alfa está associado ao aumento da transcrição desta citocina (WILSON *et al.*, 1997) e tem sido objeto de intensa pesquisa em doenças inflamatórias, como marcador de gravidade. Esse polimorfismo tem sido associado com a morbidade e mortalidade na malária cerebral e choque séptico (ZHANG *et al.*, 2003). No estudo de Jae-yong; Kin (2004) associaram o alelo G do polimorfismo G-308A na região promotora do gene do TNF-alfa com fator de risco para o infarto cerebral. No estudo de Lee *et al.* (2004) associaram o alelo A como fator protetor a eventos de AVC isquêmico. Além disso, Karahan *et al.* (2004) não associaram o alelo A na região promotora do TNF-alfa com eventos de AVC, sendo esse estudo realizado em crianças na Turquia.

Baseado no exposto, julgamos importante a investigação de marcadores genéticos de risco, que possam estar associados ao aumento na expressão e afinidade de moléculas de adesão, ICAM-1 e VCAM-1, concentração sérica aumentada de TNF-alfa e IL-8 e correlação com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes portadores de anemia falciforme.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar polimorfismos em genes de moléculas de adesão e de citocinas pro-inflamatórias correlacionando com os níveis séricos destas citocinas, bem como dados hematológicos e alterações fenotípicas apresentadas por pacientes pediátricos com anemia falciforme em Salvador-BA.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar a frequência dos polimorfismos -833 na região promotora no gene da VCAM-1, 1238 no exon 6 do gene VCAM-1 e 469 no exon 6 do gene da ICAM-1;

2.2.2 Determinar a frequência de polimorfismos -308 na região promotora do gene do TNF-alfa e -251 na região promotora do gene da IL-8, associando com as concentrações séricas;

2.2.3 Associar as frequências dos polimorfismos encontrados a marcadores genéticos de prognóstico classicamente descritos na anemia falciforme, como os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S e a talassemia alfa2 deleção 3.7 Kb;

2.2.4 Associar a frequência dos polimorfismos encontrados aos níveis de hemoglobina fetal (Hb F) apresentados por esses pacientes;

2.2.5 Relacionar os polimorfismos encontrados aos dados hematológicos e fenotípicos dos pacientes, incluindo a ocorrência dos fenômenos vaso-oclusivos.

3. JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme acomete mundialmente milhões de pessoas, sendo que na Bahia a heterozigose para a hemoglobina S (AS) ocorre em frequência de 4,5 a 15,7%, quando diferentes grupos da população foram investigados (AZEVEDO *et al.*, 1980) e frequência de 9,8% para os heterozigotos AS e 0,2% para os homozigotos SS, em triagem de hemoglobinas realizada em recém-nascidos (ADORNO *et al.*, 2005). A prevalência elevada de hemoglobinopatias no estado da Bahia tem sido reforçada, principalmente, pelo componente africano da população (AZEVEDO *et al.*, 1980).

A clínica apresentada pelos portadores de anemia falciforme é variada, possuindo fatores prognósticos classicamente associados, tais como haplótipos ligados aos genes da globina beta S e talassemia alfa2 deleção 3.7 Kb, além de marcadores ambientais e sócio-econômicos (LYRA *et al.*, 2005).

Cumpramos ressaltar que esta heterogeneidade clínica é marcada pelo encontro de pacientes que sobrevivem até a sétima década de vida, juntamente com pacientes que apresentam gravidade clínica marcada pela presença de dor, infartos cerebrais, priapismo, dactilia, retinopatia, infecções recorrentes, danos em órgãos e óbito precoce (ADAMS *et al.*, 2003).

Sendo assim, propomos o estudo de polimorfismos da K469E no gene da ICAM-1, T-833C na região promotora do gene da VCAM-1, G1238C no gene da VCAM-1, A-251T na região promotora do gene da IL-8 e G-308A na região promotora do gene do TNF-alfa em portadores de anemia falciforme, visando investigar possíveis associações com o fenótipo apresentado pelo paciente, bem como dados hematológicos e níveis séricos dessas citocinas.

A realização deste estudo contribuirá para o estabelecimento da frequência desses polimorfismos gênicos, avaliando uma possível participação como fatores prognósticos no curso clínico da doença.

4. CASUÍSTICA

A nossa casuística foi composta por 125 indivíduos portadores de anemia falciforme na faixa etária de 2 a 17 anos, sendo 54 do gênero feminino e 71 do masculino. Os pacientes estão em seguimento ambulatorial na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), que é o centro de referência em doenças hematológicas e doação de sangue, onde foram assinados os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE), coletadas amostras de sangue e realizado o preenchimento dos questionários de levantamento epidemiológico. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM / FIOCRUZ) onde foi realizado o estudo molecular e epidemiológico dos polimorfismos A469G da ICAM-1; T-833C e G1238C da VCAM-1; A-251T da IL-8 e G-308A do TNF-alfa e para o Laboratório ATGC (Faculdade de Farmácia, UFBA) para confirmação do padrão de hemoglobinas e realização de investigação hematológica. Os polimorfismos gênicos também foram investigados em 200 amostras representativas da população de Salvador –Bahia (esclarecendo que essas amostras serão analisadas apenas para avaliar como estão os polimorfismos na população em geral, não sendo considerada como grupo controle) e proveniente do Projeto Bahia Azul, cedidas pelo Dr Bernardo Galvão de Castro, coordenador do LASP (Laboratório Avançado de Saúde Pública) - CPqGM / FIOCRUZ.

Foram considerados como critérios de inclusão no estudo estar na faixa etária de 2-17 anos; possuir perfil de hemoglobinas compatível com anemia falciforme; estar em uma fase estável da doença e ter o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 1) assinado pelo responsável, com aceitação do menor.

Como critérios de exclusão foram considerados a recusa em assinar o TCLE; ausência de dados no prontuário; não confirmação do perfil de hemoglobinas para anemia falciforme; estar

sob terapia transfusional e apresentação de processos infecciosos. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM / FIOCRUZ-BA (SISNEP n° FR-76544), conforme a resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde.

5. MÉTODOS

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), para realização das análises hematológicas, de hemoglobinas e moleculares, e 5 mL sem aditivos para as análises sorológicas.

5.2 Análises hematológicas

A caracterização hematológica foi realizada em contador eletrônico de células (*Coulter Count T-890*).

5.3 Análises de hemoglobinas, Talassemia-alfa 2 3.7 kb e Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S

No grupo de pacientes estudados foi confirmado o perfil SS de hemoglobinas, sendo que a talassemia-alfa 2 3.7kb e os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S já haviam sido previamente investigados durante o doutorado do aluno Fábio Couto.

5.4 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 300 uL de sangue total, utilizando o kit de extração PROMEGA (*Wizard Genomic, PROMEGA, Madison, USA*), segundo o protocolo do fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento das análises.

5.5 Análises Moleculares

A caracterização molecular dos polimorfismos gênicos foi realizada utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) que permitiram a amplificação de seqüências específicas pela técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) (SEITZER *et al.*, 1997; TAYLOR *et al.*, 2002; HEINZMANN *et al.*, 2004; YAMASHITA *et al.*, 2005).

Após a amplificação dos fragmentos desejados, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (SIGMA, USA) em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) pH 8,3 e posteriormente digeridos com endonucleases de restrição específicas para cada caso. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (SIGMA, USA) durante 120 minutos a 60 volts e corados com brometo de etídio a 0,002%. O corante azul-de-bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%) foi utilizado na proporção de 1:6 para acompanhamento visual das amostras durante a eletroforese. Para cada reação foram utilizados controles positivos e negativos visando testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade dos resultados.

5.5.1 Estudo molecular do polimorfismo A469G no exon 6 do gene da ICAM-1

A reação da PCR para a pesquisa do polimorfismo A469G no exon 6 do gene da ICAM-1 foi realizada em tampão contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,4; 3,5 mM de MgCl₂; 200 uM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (*Invitrogen, Brazil*); 12,5 pmoles de cada

oligonucleotídeo sintético específico (tabela 1); 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante (*Invitrogen, Brazil*) e 2 uL de DNA genômico (aproximadamente 0,5 ug) em um volume final de 50uL. A reação foi realizada em termociclador gradiente (*Eppendorf, Germany*) e consistiu de 1 ciclo inicial a 96°C por 12 minutos, seguido de 40 ciclos contendo 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 57,3°C e 40 segundos a 72°C; após estes ciclos foi realizado um ciclo final de 10 minutos a 72°C, com obtenção de um fragmento de 110 pares de bases (pb) (YAMASHITA *et al.*, 2005).

A digestão dos produtos amplificados na reação de PCR foi realizada pela técnica de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (*RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando a enzima de restrição *Bst* UI (1U) (*New England Biolabs, USA*), após incubação a 60°C durante 3 horas. Os produtos obtidos foram analisados em gel de poliacrilamida a 7% e estão descritos na tabela 1 (YAMASHITA *et al.*, 2005).

5.5.2 Estudo molecular dos polimorfismos T-833C e G1238C localizados respectivamente na região promotora e no exon 6 do gene da VCAM-1

A reação de *Nested-PCR* (PCR duplo) para a pesquisa dos polimorfismos T-833C na região promotora e G1238C no gene da VCAM-1 foi realizada em tampão contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,4; 2,0 mM de MgCl₂; 200 uM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico (tabela 1); 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante e 2 uL de DNA genômico (aproximadamente 0,5 ug) em um volume final de 50uL. A reação foi realizada em termociclador gradiente e consistiu de 1 ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos contendo 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 56°C e 2 minutos e 30 segundos a 72°C; após esta etapa foi realizado um ciclo final de 10 minutos a 72°C, com obtenção de um fragmento de 2267 pb (TAYLOR *et al.*, 2002).

Na segunda etapa do *Nested-PCR* para a pesquisa do polimorfismo T-833C no gene da VCAM-1 foi utilizado tampão contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,4; 2,5 mM de MgCl₂; 200 μM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico (tabela 1); 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante e 2 μL do produto da PCR obtido na primeira reação em um volume final de 50μL. A reação foi realizada em termociclador gradiente e consistiu de 1 ciclo inicial a 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos contendo 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 56,5°C e 40 segundos a 72°C; após esta etapa foi realizado um ciclo final de 10 minutos a 72°C, com obtenção de um fragmento de 259 pb (TAYLOR *et al.*, 2002).

A digestão dos produtos amplificados na reação de PCR foi realizada utilizando a enzima de restrição *Rsa* I (1U) (*Invitrogen, Brazil*), após incubação a 37°C durante 12 horas. Os produtos obtidos estão descritos na tabela 1 (TAYLOR *et al.*, 2002).

Na segunda etapa do *Nested-PCR* para a pesquisa do polimorfismo G1238C no gene da VCAM-1 foi utilizado tampão contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,4; 3,5 mM de MgCl₂; 200 μM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico (tabela 1); 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante e 2 μL do produto da PCR obtido na primeira reação em um volume final de 50μL. A reação foi realizada em termociclador gradiente e consistiu de 1 ciclo inicial a 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos contendo 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55,3°C e 40 segundos a 72°C; após esta etapa foi realizado um ciclo final de 10 minutos a 72°C, com obtenção de um fragmento de 251 pb (TAYLOR *et al.*, 2002).

A digestão dos produtos amplificados na reação de PCR foi realizada utilizando a enzima de restrição *Cac* 8I (1U) (*New England Biolabs, USA*), após incubação a 37°C durante 12 horas. Os produtos obtidos estão descritos na tabela 1 (TAYLOR *et al.*, 2002).

5.5.3 Estudo molecular do polimorfismo A-251T na região promotora do gene da IL-8

A reação de PCR para a pesquisa do polimorfismo A-251T na região promotora do gene da IL-8 foi realizada em tampão contendo 200 mM de Tris-HCl pH 8,4; 3,5 mM de MgCl₂; 200 μM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico (tabela 1); 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante e 2 uL de DNA genômico (aproximadamente 0,5 ug) em um volume final de 50uL. A reação foi realizada em termociclador gradiente e consistiu de 1 ciclo inicial a 94°C por 10 minutos seguido de 35 ciclos contendo 45 segundos a 94°C; 45 segundos a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C; após esta etapa foi realizado um ciclo final de 10 minutos a 72°C, com obtenção de um fragmento de 174 pb (HEINZMANN *et al.*, 2004).

A digestão dos produtos amplificados na reação de PCR, foi realizada utilizando a enzima de restrição *Ase* I (1U) (*New England Biolabs*), após incubação a 37°C durante 12 horas. Os produtos obtidos estão descritos na tabela 1 (HEINZMANN *et al.*, 2004).

5.5.4 Estudo molecular do polimorfismo G-308A na região promotora do gene do TNF-alfa

A reação de PCR para a pesquisa do polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa foi realizada em tampão contendo 50mM de Tris-HCl pH 8,4; 1,7 mM de MgCl₂; 200uM da mistura de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs); 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético específico (tabela 1); 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase recombinante e 2 uL de DNA genômico (aproximadamente 0,5 ug) em um volume final de 50uL. A reação foi realizada em termociclador gradiente e consistiu de 1 ciclo inicial a 94°C por 10 minutos seguido de 35 ciclos contendo 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C;

após esta etapa foi realizado um ciclo final de 10 minutos a 72°C, com obtenção de um fragmento de 107 pb (SEITZER *et al.*, 1997).

A digestão dos produtos amplificados da reação de PCR foi realizada utilizando a enzima de restrição *Nco* I (1U) (*Invitrogen, Brazil*), após incubação a 37°C durante 12 horas. Os produtos obtidos estão descritos na tabela 1 (SEITZER *et al.*, 1997).

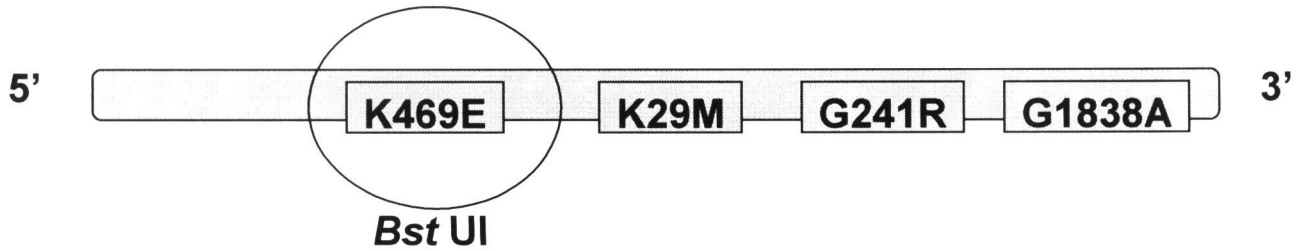
5.5.5 Dosagem sorológica do TNF-alfa e IL-8

A reação de ELISA para detecção dessas citocinas foi realizada utilizando 2 ug/mL anticorpo de captura anti-citocina em solução contendo 0,1M Na₂HPO₄ (*BD Biosciences Pharmingen, USA*) em um volume de 100 ul por poço durante 12 horas a 4°C; posteriormente foi realizado o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas através do acréscimo de 200 ul de tampão fosfato salino / soro fetal bovino 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 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 100 uL 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 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.

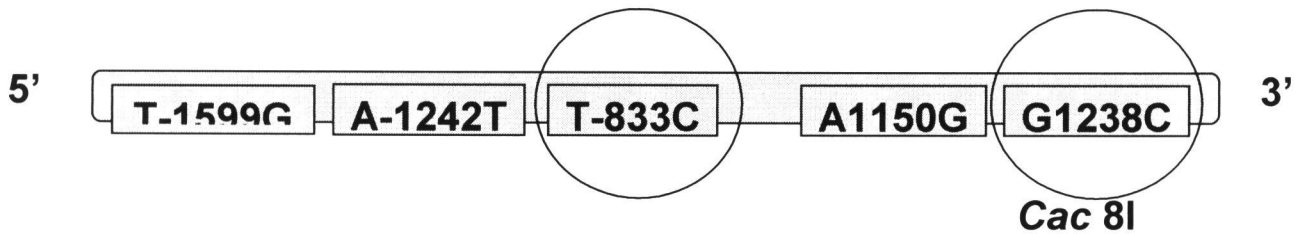
O limites de detecção indicado pela *BD Biosciences Pharmingen* é de 15 - 2000 pg/mL para o TNF-alfa e de 7,8 – 1000 pg/mL para a IL-8.

5.6 Desenho esquemático dos genes estudados:

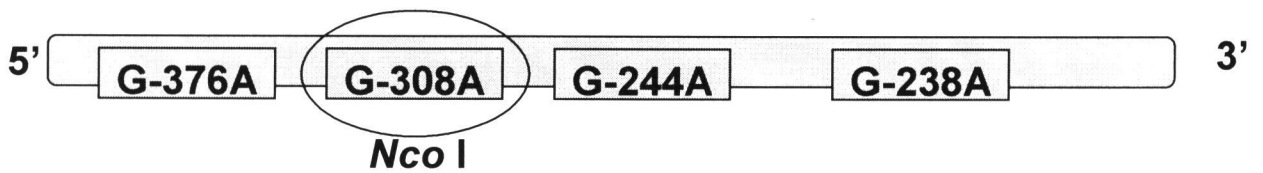
K469E no exon 6 do gene da ICAM-1



T-833C na região promotora e G1238C no exon 6 do gene da VCAM-1



G-308A na região promotora do gene do TNF-alfa



A-251T na região promotora do gene da IL-8

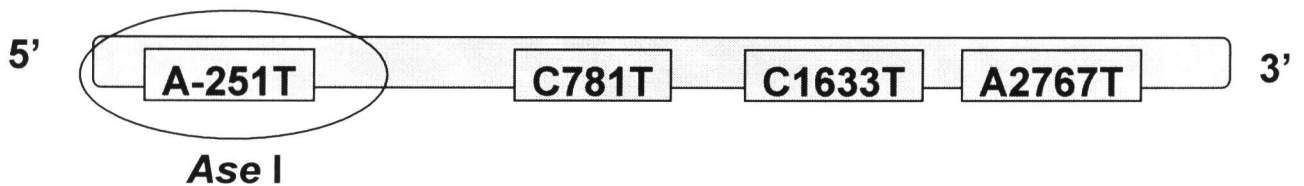


Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos sintéticos, tipos de enzimas de restrição e tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de PCR-RFLP realizadas para investigação dos polimorfismos gênicos.

Primers 5'→3'	Localização do alvo	Enzima de Restrição	Tamanho dos fragmentos (pb)
ICAM-1 A469G D -CCATCGGGGAATCAGTG R - ÂCAGAGCACATTCACGGTC YAMASHITA et al., 2005	EXON 6	<i>Bst</i> UI	110 AA→110 AG→110+85+25 GG→85+25
VCAM-1 Nested-PCR D -TATTTCAAGTGGGGACAAGGC R-GTCGTGATGAGAAAATAGTGGTTC TAYLOR et al., 2002			2267
VCAM-1 T-833C D -CAAGAGATTTGCCACTTCAGATG R -AAAAGGGACACCATAACTTCTTAG TAYLOR et al., 2002	REGIÃO PROMOTORA -833	<i>Rsa</i> I	259 TT→259 TC→259+212+47 CC→212+47
VACM-1 G1238C D -CGTTTTTGCTTGCGATTTG R -CCAGTATCTTCAATGGTAGGGATG TAYLOR et al., 2002	EXON 6	<i>Cac</i> 8I	251 GG→241+10 GC→241+194+47+10 CC→194+47+10
IL-8 A-251T D -CCATCATGATAGCATCTGTA R -CCACAATTTGGTGAATTA HEINZMANN et al., 2004	REGIÃO PROMOTORA -251	<i>Ase</i> I	174 AA → 174 AT→174+138+36 TT→138+36
TNF-alfa G-308A D -AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT R -TCCTCCCTGCTCCGATTCCG SEITZER et al., 1997	REGIÃO PROMOTORA -308	<i>Nco</i> I	107 GG→87+20 GA→107+87+20 AA→107

D= Direto, R= Reverso

5.7 Dados Clínicos

Os dados clínicos foram obtidos através de avaliação retrospectiva dos prontuários médicos na HEMOBA e compreenderam os fenômenos de vaso-oclusão (síndrome mão-pé, crise algica, priapismo, dor abdominal e síndrome torácica aguda); seqüestro esplênico; AVC; infecção do trato respiratório superior; pneumonia e infecção do trato urinário.

5.8 Análises Estatísticas

Após a realização das análises laboratoriais e da revisão dos prontuários dos pacientes, foi elaborado um banco de dados no *software* EPI-INFO 6.04., destinado às análises estatísticas. As análises foram realizadas através do teste Qui Quadrado com intervalo de confiança de 95%. Os testes ANOVA e Kruskal-Wallis foram utilizados para as análises de variáveis com distribuição heterogênea. O valor de p considerado como limite de significância estatística foi de $\leq 0,05$ (5%).

6. RESULTADOS

6.1 Dados fenotípicos dos pacientes

Dos 125 pacientes com anemia falciforme investigados neste estudo 71 são do gênero masculino e 54 são do gênero feminino, apresentam média de idade de $8.5 \pm 3,8$ anos e estão distribuídos na faixa etária de 2 a 17 anos. Dessa forma, 33 estão na faixa etária de 2 a 5 anos, 39 estão na faixa etária de 5 a 9 anos, 35 estão na faixa etária de 9 a 13 anos e 18 estão na faixa etária de 13 a 17 anos.

As tabelas 2 e 3 apresentam de forma sumarizada os dados clínicos dos pacientes, sendo que os fenômenos vaso-oclusivos constituíram as principais causas de morbidade na população estudada. A tabela 4 apresenta os tipos de eventos vaso-oclusivos distribuídos no total de 100 pacientes. A presença de úlcera de perna e osteomielite foi encontrada em apenas um paciente.

Tabela 2- Manifestações clínicas apresentadas por 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	Nº PACIENTES / MÉDIAS	GÊNERO	
		MASCULINO (71)	FEMININO (54)
VASO-OCCLUSÃO	(100/125) $3.30 \pm 0,27$ (1-13)	(60/71) $3.1 \pm 2,6$ OD 1,24 IC (0,4 - 3,4)	(40/54) $3.5 \pm 3,2$
AVC	(8/125) $0,08 \pm 0,03$ (1-2)	(5/71) $0.1 \pm 0,3$ OD 1,36 IC (0,2 - 7,60)	(3/54) $0.1 \pm 0,3$
PNEUMONIA	(57/125) $0,92 \pm 0,10$ (1-5)	(33/71) $0.8 \pm 1,1$ OD 1,09 IC (0,5 - 2,3)	(24/54) $1.0 \pm 1,2$
SEQUESTRO ESPLÊNICO	(18/125) $0,27 \pm 0,07$ (1-4)	(10/71) $0.3 \pm 0,7$ OD 1,15 IC (0,3 - 3,4)	(8/54) $0.3 \pm 0,7$
INFECÇÃO DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR	(19/125) $0,22 \pm 0,05$ (1-4)	(11/71) $0.2 \pm 0,5$ OD 0,9 IC (0,3 - 2,6)	(8/54) $0.2 \pm 0,6$
INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO	(6/125) $0,05 \pm 0,02$ (1)	(3/71) $0.04 \pm 0,2$ OD 0,75 IC (0,1 - 4,9)	(3/54) $0,05 \pm 0,2$
TOTAL	125 PACIENTES		

OD ODDS RATIO
IC INTERVALO DE CONFIANÇA

Tabela 3– Frequência de manifestações clínicas distribuídas por faixa etária, em anos, em 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	IDADE (ANOS) Nº PACIENTES ()				Valor de P
	2-----5 (33)	5-----9 (39)	9-----13 (35)	13-----17 (18)	
VASO-OCCLUSÕES (100)	25 (75,8%)	33 (84,6%)	25 (77,1%)	17 (94,4%)	*** 0,01982
AVC (8)	1 (3%)	1 (2,6%)	5 (14%)	1 (5,6%)	** 0,15082
SEQUESTRO ESPLÊNICO (18)	5 (15,2%)	11 (28,2%)	2 (5,7%)	0 (0%)	*** 0,00304
INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO (6)	1 (3%)	4 (10,3%)	1 (2,9%)	0 (0%)	* 0,27103
INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR(19)	6 (18,2%)	6 (15,4%)	5 (14,3%)	2 (11,2%)	** 0,95920
PNEUMONIA (57)	11 (33,3%)	23 (58,9%)	11 (31,4%)	12 (66,6%)	*** 0,05242
TOTAL	125 PACIENTES				

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS *** QUI-QUADRADO

Tabela 4– Frequência de eventos de vaso-oclusão distribuídos por faixa etária, em anos, em 100 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

POS DE VOC	IDADE (ANOS) Nº PACIENTES ()	2-----5	5-----9	9-----13	13-----17
		(25)	(33)	(25)	(17)
SÍNDROME MÃO-PÉ (6)		3 (12,0%)	2 (6,0%)	0 (0%)	1 (5,9%)
CRISE ÁLGICA (34)		5 (20,0%)	9 (27,3%)	12 (48,0%)	8 (47,0%)
SÍNDROME TORÁCICA AGUDA (1)		0 (0%)	0 (0%)	1 (4,0%)	0 (0%)
DOR ABDOMINAL (5)		2 (8,0%)	2 (8,0%)	0 (0%)	1 (5,9%)
SÍNDROME MÃO-PÉ / CRISE ÁLGICA (16)		8 (32,0)	5 (15,2%)	2 (8,0%)	1 (5,9%)
SÍNDROME MÃO-PÉ / DOR ABDOMINAL (3)		2 (8,0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)
CRISE ÁLGICA / PRIAPISMO (2)		0 (0%)	1 (3,0)	0 (0%)	1 (5,9%)
CRISE ÁLGICA / SÍNDROME TORÁCICA AGUDA (3)		0 (0%)	1 (3,0%)	1 (4,0%)	1 (5,9%)
CRISE ÁLGICA / DOR ABDOMINAL (19)		3 (12,0%)	6 (18,0%)	8 (32,0%)	2 (11,8%)
SÍNDROME TORÁCICA AGUDA / DOR ABDOMINAL (1)		0 (0%)	1 (3,0%)	0 (0%)	0 (0%)
SÍNDROME MÃO-PÉ / CRISE ÁLGICA / PRIAPISMO (1)		0 (0%)	1 (3,0%)	0 (0%)	0 (0%)
SÍNDROME MÃO-PÉ / CRISE ÁLGICA / SÍNDROME TORÁCICA AGUDA (1)		0 (0%)	1 (3,0%)	0 (0%)	0 (0%)
SÍNDROME MÃO-PÉ / CRISE ÁLGICA / DOR ABDOMINAL (7)		2 (8,0%)	4 (12,0%)	1 (4,0%)	0 (0%)
CRISE ÁLGICA / SÍNDROME TORÁCICA AGUDA / DOR ABDOMINAL (1)		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,9%)
TOTAL		100 PACIENTES			

6.2. Número de leucócitos e níveis de hemoglobina fetal associados às manifestações clínicas.

Os dados hematológicos de 113 dos 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme apresentaram média de $7,8 \pm 0,1$ para hemoglobina; de $23,3 \pm 0,4$ para o hematócrito; de $2,6 \pm 0,05$ para o nº de hemácias; de $89 \pm 0,7$ para o VCM; de $29,6 \pm 0,3$ para o HCM; de $33,2 \pm 0,2$ para o CHCM e de $435.867 \pm 13,4$ para o nº de plaquetas. A média do número de leucócitos foi de $14.956 \pm 0,6$. Entretanto, para análise desse dado, foram considerados os valores de referência específicos para cada faixa etária, sendo considerado até 16.000 para a faixa etária de 2 a 5 anos; até 14.500 para a faixa etária de 5 a 9 anos e até 13.500 para a faixa etária de 9 a 17 anos (LEE *et al.*, 1999).

O número de leucócitos em diferentes faixas etárias foi avaliado como possível fator de risco para as manifestações clínicas de doença. Estes resultados estão sumarizados nas tabelas 5 - 7, não tendo sido encontradas associações estatística.

Os parâmetros hematológicos foram avaliados juntamente com os níveis de hemoglobina fetal entre 124 dos 125 pacientes, Hb F $< 10,0\%$ e $\geq 10,0\%$, não tendo sido encontrada associação entre o número de leucócitos e os níveis de hemoglobina fetal (Tabela 8). Entretanto, os pacientes que apresentaram níveis de hemoglobina fetal $\geq 10,0\%$ apresentaram número mais elevados de hemácias ($p = 0,03339$), maior nível de hemoglobina ($p = 0,00135$) e maior hematócrito ($p = 0,00076$) (Tabela 8). Quando correlacionados níveis de Hb F e as manifestações clínicas os resultados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos investigados (Tabela 9).

Tabela 5– Correlação entre o número de leucócitos e manifestações clínicas na faixa etária de 2 a 5 anos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS Nº PACIENTES ()	Nº LEUCÓCITOS		Valor de P
	LEUCÓCITOS < 16.000 (14)	LEUCÓCITOS ≥ 16.000 (15)	
EVENTOS DE VASO- OCCLUSÃO	(8/14) 3.7 ± 3,1	(5/15) 2.1 ± 1,9	** 0,19179 OD 2,6 IC (0,4 - 16,1) *
EVENTOS DE AVC	(0/14) 0.0 ± 0,0	(1/15) 0.06 ± 0,3	0,33399 OD 0,0 IC (0,0 - 19,6) *
EVENTOS DE SEQÜESTRO ESPLÊNICO	(2/14) 0.4 ± 1,1	(3/15) 0.4 ± 1,0	0,94509 OD 0,6 IC (0,1 - 6,4) *
EVENTOS DE PNEUMONIA	(5/14) 0.6 ± 0,8	(6/15) 0.7 ± 1,1	0,76664 OD 0,8 IC (0,1 - 4,8) *
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO	(3/14) 0.2 ± 0,4	(2/15) 0.1 ± 0,3	0,58031 OD 1,7 IC (0,2 - 19,1) **
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO	(0/14) 0.0 ± 0,0	(1/15) 0.1 ± 0,3	0,33399 OD 0,0 IC (0,0 - 19,6)
TOTAL	29 PACIENTES		

LEUCO - Nº Leucócitos (uL);

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

OD ODDS RATIO

IC INTERVALO DE CONFIANÇA

Tabela 6– Correlação entre o número de leucócitos e manifestações clínicas na faixa etária de 5 a 9 anos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS Nº PACIENTES ()	Nº LEUCÓCITOS LEUCÓCITOS < 14.500 (17)	LEUCÓCITOS ≥ 14.500 (18)	Valor de P
EVENTOS DE VASO- OCCLUSÃO	(10/17) 3.7 ± 2,4	(9/18) 2.9 ± 2,6	* 0,35002 OD 1,4 IC (0,3 – 6,8)
EVENTOS DE AVC	(0/17) 0.0 ± 0,0	(1/18) 0.1 ± 0,2	* 0,33113 OD 0,0 IC (0,0 – 19,2)
EVENTOS DE SEQÜESTRO ESPLÊNICO	(5/17) 0.4 ± 0,7	(4/18) 0.6 ± 1,1	* 0,56761 OD 1,4 IC (0,2 – 8,6)
EVENTOS DE PNEUMONIA	(8/17) 0.8 ± 1,0	(12/18) 1.2 ± 1,0	* 0,25182 OD 0,4 IC (0,1 – 2,1)
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO	(1/17) 0.2 ± 0,7	(4/18) 0.4 ± 1,0	* 0,38662 OD 0,2 IC (0,1 – 2,6)
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO	(1/17) 0.06 ± 0,2	(3/18) 0.2 ± 0,3	** 0,32323 OD 0,3 IC (0,1 - 4,1)
TOTAL	35 PACIENTES		

LEUCO - Nº Leucócitos (uL);

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

OD ODDS RATIO

IC INTERVALO DE CONFIANÇA

Tabela 7– Correlação entre o número de leucócitos e manifestações clínicas na faixa etária de 9 a 17 anos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS Nº PACIENTES ()	Nº LEUCÓCITOS LEUCÓCITOS < 13.500 (28)	LEUCÓCITOS ≥ 13.500 (21)	Valor de <i>P</i>
EVENTOS DE VASO- OCLUSÃO	(14/28) 3.2 ± 3,7	(12/21) 3.2 ± 2,8	* 0,90355 OD 0,7 IC (0,2 – 2,7) **
EVENTOS DE AVC	(4/28) 0.3 ± 0,7	(2/21) 0.1 ± 0,3	0,64380 OD 1,6 IC (0,2 - 14,1) **
EVENTOS DE SEQÜESTRO ESPLÊNICO	(2/28) 0.1 ± 0,3	(0/21) 0.0 ± 0,0	0,21938 IC INDEFINIDO *
EVENTOS DE PNEUMONIA	(12/28) 0.8 ± 1,4	(10/21) 0.8 ± 1,2	0,69079 OD 0,8 IC (0,2- 3,0) *
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO	(4/28) 0.2 ± 0,3	(3/21) 0.1 ± 0,2	0,70260 OD 1,0 IC (0,1 - 6,6) **
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO	(1/28) 0.1 ± 0,2	(0/21) 0.0 ± 0,0	0,39212 IC INDEFINIDO
TOTAL	31 PACIENTES		

LEUCO - Nº Leucócitos (uL);

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

OD ODDS RATIO

IC INTERVALO DE CONFIANÇA

Tabela 8 – Correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e parâmetros hematológicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

DADOS HEMATOLÓGICOS	Hb FETAL Nº PACIENTES ()	VR	Hb FETAL < 10 % (50)	Hb FETAL ≥ 10% (62)	Valor de P
	LEUCO		4.5-16.0 X 10 ⁹ /L	15.2 ± 6,9	14.7 ± 5,8
HM		4.0-5.2 10 ¹² /L	2.5 ± 0,5	2.7 ± 0,6	* 0,03339
HG		11.5-15.5 g/dL	7.3 ± 1,0	8.0 ± 1,3	** 0,00135
HT		35-45 (%)	22.0 ± 3,4	24.5 ± 4,1	* 0,00076
VCM		77-95 fL	88.1 ± 7,8	89.7 ± 8,5	* 0,29232
HCM		24-30 pg	29.5 ± 3,4	29.7 ± 3,6	* 0,73060
CHCM		31-34 g/L	33.4 ± 2,1	33.0 ± 2,0	* 0,34364
PLA		150-450 X1000/uL	454.800 ± 145,943	417.823 ± 138967	* 0,17520

LEUCO - Nº Leucócitos (uL); HM - Hemácias (x 1000000/uL); HG - Hemoglobina (g/dL); HT - Hematócrito (%); VCM - Volume corpuscular médio (fl); HCM - Hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL); PLA - Plaquetas (uL); VR – Valores de Referência

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

Tabela 9- Correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e a média dos eventos clínicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador - Bahia.

Hb FETAL Nº PACIENTES ()	Hb FETAL < 10 % (55) Nº / média dos eventos	Hb FETAL ≥ 10% (69) Nº / média dos eventos	Valor de P
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS			
EVENTOS DE VASO- OCCLUSÃO	(28/55) 3.5 ± 3,2	(34/69) 3.1 ± 2,7	* 0,54730 OD 1,0 IC (0,4 – 2,3) **
EVENTOS DE AVC	(5/55) 0.1 ± 0,5	(2/69) 0.03 ± 0,1	0,12965 OD 3,3 IC (0,5 – 26,3) *
EVENTOS DE SEQÜESTRO ESPLÊNICO	(7/55) 0.2 ± 1,0	(11/69) 0.3 ± 0,8	0,63574 OD 0,7 IC (0,2 – 2,3) **
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO	(11/55) 0.3 ± 0,8	(8/69) 0.1 ± 0,3	0,14901 OD 1,9 IC (0,6 – 5,7) *
EVENTOS DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO	(2/55) 0.04 ± 0,2	(4/69) 0.06 ± 0,2	0,58111 OD 0,6 IC (0,1 – 4,1) *
EVENTOS DE PNEUMONIA	(29/55) 1.0 ± 1,2	(27/69) 0.7 ± 1,1	0,18605 OD 1,7 IC (0,8 – 3,7)
TOTAL	124 PACIENTES		

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS
OD ODDS RATIO
IC INTERVALO DE CONFIANÇA

6.3. Frequência dos polimorfismos gênicos, talassemia alfa e haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S.

As frequências dos polimorfismos gênicos – 833 e 1238 no gene da VCAM-1; 469 no gene da ICAM-1; – 308 no gene do TNF-alfa e – 251 no gene da IL-8 estão sumarizados na tabela 10. As figuras de 3 – 7 apresentam géis identificando os polimorfismos em questão.

A partir das análises moleculares não foram encontradas diferenças estatísticas quando os genótipos dos pacientes com anemia falciforme foram comparados aos encontrados em um grupo de indivíduos da população de Salvador. Os resultados estão apresentados na tabela de 10.

A distribuição das frequências alélicas dos cinco polimorfismos investigados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 10- Frequências genotípicas dos polimorfismos investigados em pacientes pediátricos com anemia falciforme e em grupo de indivíduos da população de Salvador - Bahia.

POLIMORFISMOS	PACIENTES	GRUPO POPULACIONAL
VCAM-1 T-833C		
TT	98 (78%)	170 (77%)
TC	27 (22%)	52 (23%)
CC	00 (00%)	00 (00%)
VCAM-1 G1238C		
GG	110 (88%)	173 (86,5%)
GC	15 (12%)	27 (13,5%)
CC	00 (00%)	00 (00%)
ICAM-1 K469E		
AA	67 (53,6%)	
AG	50 (40%)	
GG	08 (6,4%)	
TNF-alfa G-308A		
GG	93 (74%)	153 (72%)
GA	30 (24%)	55 (26%)
AA	02 (2%)	04 (2%)
IL-8 A-251T		
AA	16 (13%)	26 (13,2%)
AT	66 (53%)	97 (49,5%)
TT	43 (34%)	73 (37,3%)

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Não foi observada associação estatística entre os dois grupos

Os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S foram investigados nos 125 pacientes, sendo 22 (17,6%) CAR/CAR; 59 (47,2%) CAR/BEN; dois (1,6%) CAR/CAM; sete (5,6%) CAR/ATP; três (2,4%) BEN/ CAM; 27 (21,6%) BEN/BEN e cinco (4,0%) BEN/ ATP.

A talassemia- α -2^{3.7kb} foi investigada nos 125 pacientes, sendo que 28 indivíduos (22,4%) foram heterozigotos e um (0,8%) foi homozigoto para este tipo de talassemia.

6.4. Associação entre os polimorfismos em moléculas de adesão; citocinas pró-inflamatórias e manifestações clínicas.

A partir da análise dos resultados dos polimorfismos e a correlação com as manifestações clínicas foram obtidas diferenças estatísticas para a heterozigose no polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, sendo que estes pacientes apresentaram número maior de eventos vaso-oclusivos ($4.8 \pm 3,7$; $p = 0,036$); destes, 38% apresentaram crise álgica e 31% crise álgica e dor abdominal. Para o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa os pacientes portadores, em heterozigose ou homozigose, apresentaram número maior de eventos de seqüestro esplênico ($0.50 \pm 1,1$; $p = 0,048$) (tabela 11).

Tabela 11 - Correlação dos polimorfismos em genes de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias com aspectos fenotípicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador-Bahia.

Polimorfismo; () N ^o Pacientes	N ^o VASO- OCLUSÃO	N ^o PNEUMONIA	N ^o SEQÜESTRO ESPLÊNICO	N ^o AVC	N ^o INFEÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO	N ^o INFEÇÕES TRATO URINÁRIO
VCAM -833 TT (98)	(83/98) 3,53 ± 2,9	(43/98) 0,95 ± 1,2	(14/98) 0,28 ± 0,8	(7/98) 0,10 ± 0,4	(15/98) 0,22 ± 0,6	(3/98) 0,03 ± 0,2
TC+CC (27)	(21/27) 2,55 ± 2,8	(14/27) 0,76 ± 0,9	(4/27) 0,22 ± 0,6	(1/27) 0,03 ± 0,2	(4/27) 0,18 ± 0,5	(3/27) 0,11 ± 0,3
VCAM 1238 GG (110)	(91/110) 3,11 ± 2,7	(50/110) 0,90 ± 1,2	(18/110) 0,30 ± 0,8	(6/110) 0,07 ± 0,3	(19/110) 0,24 ± 0,6	(5/110) 0,04 ± 0,2
GC+CC (15)	(13/15) 4,80 ± 3,7	(7/15) 1,00 ± 1,2	(0/15) 0,00 ± 0,0	(2/15) 0,20 ± 0,5	(0/15) 0,00 ± 0,0	(1/15) 0,06 ± 0,2
#						
ICAM 469 AA (67)	(56/67) 3,40 ± 2,8	(30/67) 0,90 ± 1,2	(11/67) 0,32 ± 0,8	(6/67) 0,13 ± 0,4	(12/67) 0,28 ± 0,7	(3/67) 0,04 ± 0,2
AG+GG (58)	(48/58) 3,22 ± 3,0	(27/58) 0,92 ± 1,2	(7/58) 0,20 ± 0,6	(2/58) 0,03 ± 0,2	(7/58) 0,13 ± 0,4	(3/58) 0,05 ± 0,2
IL8-251 AA (16)	(13/16) 3,6 ± 3,0	(6/16) 0,75 ± 1,1	(3/16) 0,31 ± 0,8	(1/16) 0,12 ± 0,5	(3/16) 0,31 ± 0,8	(1/16) 0,06 ± 0,2
AT+TT (109)	(91/109) 3,2 ± 3,0	(51/109) 0,94 ± 1,2	(15/109) 0,26 ± 0,8	(7/109) 0,08 ± 0,3	(16/109) 0,20 ± 0,6	(5/109) 0,04 ± 0,2
TNF -308 GG (93)	(78/93) 3,24 ± 2,7	(45/93) 0,98 ± 1,2	(10/93) 0,19 ± 0,6	(7/93) 0,09 ± 0,3	(14/93) 0,19 ± 0,5	(5/93) 0,05 ± 0,2
GA+AA (32)	(26/32) 3,53 ± 3,3	(12/32) 0,71 ± 1,1	(8/32) 0,50 ± 1,1	(1/32) 0,06 ± 0,3	(5/32) 0,28 ± 0,7	(1/32) 0,03 ± 0,2
##						

p=0,036 (ANOVA)

p= 0,048 (KRUSKAL-WALLIS)

6.5. Associação entre os polimorfismos 1238 no gene da VCAM-1, média dos eventos de vaso-oclusão, presença de talassemia-alfa 2 deleção 3.7 kb, níveis de hemoglobina fetal e haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S.

Os resultados referentes à correlação entre o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, eventos de vaso-oclusão e talassemia-alfa 2 deleção 3.7 kb, não apresentaram associação estatística significativa. Entretanto, quando realizada à associação entre o polimorfismo, eventos de vaso-oclusão e níveis de Hb F foi observado um número maior de eventos de vaso-oclusão ($6.0 \pm 4,0$; $p= 0,04238$) entre os pacientes que apresentavam o polimorfismo e níveis de Hb F menor que 10%. Além disso, foi observada associação estatística na correlação entre a presença do polimorfismo, o haplótipo CAR e aumento no número de eventos vaso-oclusão ($5.5 \pm 3,6$; $p= 0,01711$) (tabela 12).

Tabela 12- Correlação entre as médias dos eventos de vaso-oclusão, talassemia-alfa, haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S, Hb F e o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 em 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador –Bahia.

TALASSEMIA HAPLÓTIPOS Hb F	N ^o PACIENTES () POLIMORFISMO VCAM G1238C		Valor de P
	GG (110)	GC+CC (15)	
TAL- α -2 ^{3.7kb} GENOTIPO SELVAGEM (96)	(65/83) 2.8 ± 2,5	(11/13) 4.7 ± 3,8	** 0,08
TAL- α -2 ^{3.7kb} GENOTIPO MUTANTE (29)	(26/27) 4.0 ± 3,1	(2/2) 5.0 ± 4,2	* 0,70
GRUPO I (83)	(69/72) 3.2 ± 2,8	(10/11) 5.5 ± 3,6	* 0,01
GRUPO II (30)	(21/26) 3.0 ± 2,6	(3/4) 2.7 ± 3,5	* 0,86
Hb F < 10% (55)	(39/49) 3.2 ± 3,0	(6/6) 6.0 ± 4,0	** 0,04
Hb F ≥ 10% (69)	(51/60) 3.0 ± 2,5	(7/9) 4.0 ± 3,5	* 0,33

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

GRUPO I → Haplótipos CAR/CAR ; CAR/BEN; CAR/CAM

GRUPO II → Haplótipos BEN/ BEN; BEN/CAM

6.6. Associação entre o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa, média dos eventos de seqüestro esplênico, presença de talassemia-alfa 2 deleção 3.7 kb, níveis de hemoglobina fetal e haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S.

Os resultados referentes à correlação entre o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa, eventos de seqüestro esplênico e presença de talassemia-alfa 2 deleção 3.7 kb, não apresentaram associação estatística significativa. Além disso, não foi observada associação estatística entre a presença do polimorfismo, número de eventos de seqüestro esplênico e níveis de Hb F. Contudo, foi observada associação estatística entre a presença do polimorfismo, o haplótipo CAR e aumento no número de eventos de seqüestro esplênico ($0.6 \pm 1,2$; $p= 0,03501$) (tabela 13).

Tabela 13- Correlação entre as médias dos eventos de sequestro esplênico, talassemia-alfa, haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S, Hb F e o polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa em 125 pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador –Bahia.

TALASSEMIA HAPLÓTIPOS Hb F	Nº PACIENTES () POLIMORFISMO TNF-alfa G-308A		Valor de P
	GG (93)	GA+AA (32)	
TAL- α -2 ^{3.7kb} GENOTIPO SELVAGEM (96)	(6/76) 0.1 ± 0,5	(4/20) 0.4 ± 1,0	** 0,10
TAL- α -2 ^{3.7kb} GENOTIPO MUTANTE (29)	(26/27) 0.4 ± 0,8	(2/2) 0.5 ± 1,1	* 0,65
GRUPO I (83)	(6/62) 0.2 ± 0,6	(6/21) 0.6 ± 1,2	** 0,03
GRUPO II (30)	(4/22) 0.3 ± 0,7	(1/8) 0.1 ± 0,3	* 0,66
Hb F < 10% (55)	(4/42) 0.2 ± 0,6	(3/13) 0.4 ± 0,8	* 0,40
Hb F ≥ 10% (69)	(5/19) 0.6 ± 1,2	(6/50) 0.2 ± 0,6	** 0,14

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

GRUPO I → Haplótipos CAR/CAR ; CAR/BEN; CAR/CAM

GRUPO II → Haplótipos BEN/ BEN; BEN/CAM

6.7. Associação entre os polimorfismos em moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e dados hematológicos.

Os resultados referentes à associação entre os polimorfismos estudados e os dados hematológicos evidenciam uma diminuição no número de hemácias ($2.2 \pm 0,3$; $p = 0,0021$); diminuição do hematócrito ($21.2 \pm 2,5$; $p = 0,0229$) e aumento do VCM ($94.9 \pm 8,1$; $p = 0,0083$) nos pacientes heterozigotos para o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1. Com relação ao polimorfismo 469 no gene da ICAM-1 observou-se diminuição dos níveis de hemoglobina ($7.4 \pm 1,1$; $p = 0,0324$) nos pacientes portadores do polimorfismo em heterozigose ou homozigose. A presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa em heterozigose ou homozigose está relacionada ao aumento no número de hemácias ($2.92 \pm 0,6$; $p = 0,01$); diminuição do VCM ($84.6 \pm 9,2$; $p = 0,0085$) e diminuição do HCM ($27.9 \pm 4,1$; $p = 0,0048$). No caso do polimorfismo -251 no gene da IL-8 observou-se aumento no número de plaquetas ($447.052 \pm 136,941$; $p = 0,04$) entre os pacientes portadores (tabela 14).

Tabela 14- Correlação entre os polimorfismos em genes de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias com os dados hematológicos em pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador-Bahia.

Polimorfismo; N ^o pacientes (n)	LEUCO VR 4.5-14.5 X 10 ⁹ /L	HM VR 4.0-5.2 10 ¹² /L	HG VR 11.5-15.5 g/dL	HT VR 35-45 (%)	VCM VR 77-95 fL	HCM VR 24-30 pg	CHCM VR 31-34 g/L	PLA VR 150-450 X1000/uL
VCAM-1 833 TT(90)	15.038 ± 6,8	2.65 ± 0,6	7.7 ± 1,3	23.3 ± 4,2	89,8 ± 8,5	29.5 ± 3,7	33.2 ± 2,0	429.411 ± 137,815
TC + CC(23)	14.635 ± 3,4	2.67 ± 0,45	7,8 ± 0,9	23.5 ± 2,9	88,7 ± 6,9	29.6 ± 3,0	33.3 ± 2,2	461.130 ± 164,453
VCAM-1 1238 GG (101)	14.770 ± 6,4	2.70 ± 0,6	7.8 ± 1,3	23.5 ± 4,0	88.3 ± 8,0	29.4 ± 3,6	33.2 ± 2,1	428.376 ± 142,149
GC + CC (12)	16.517 ± 4,6	2.20 ± 0,3	7.0 ± 0,8	21.2 ± 2,5	94.9 ± 8,1	31.5 ± 2,6	33.2 ± 2,1	498.917 ± 144,532
Valor P		0,0021 **		0,0229 **	0,0083 *			
ICAM-1 AA (61)	14.026 ± 4,7	2.3 ± 0,6	7.9 ± 1,3	23.9 ± 4,2	88.9 ± 8,2	29.7 ± 3,2	33.4 ± 1,9	444.016 ± 133,906
AG + GG (52)	16.045 ± 7,5	2,5 ± 0,5	7.4 ± 1,1	22.7 ± 3,6	89.1 ± 8,3	29.5 ± 3,9	33.0 ± 2,2	426.308 ± 154,611
Valor P			0,0324 *					
TNF-alfa GG (86)	14.995 ± 6,4	2.58 ± 0,5	7.6 ± 1,3	23.0 ± 4,0	90.2 ± 7,6	30.1 ± 3,2	33.4 ± 1,9	426.640 ± 135,650
GA + AA (27)	14.835 ± 6,0	2.92 ± 0,6	7.9 ± 1,0	24.5 ± 3,7	84.6 ± 9,2	27.9 ± 4,1	32.6 ± 2,4	465.259 ± 165,140
Valor P		0,0100 *			0,0085 *	0,0048 *		
IL-8 AA (16)	16.144 ± 12,0	2.7 ± 0,7	7,9 ± 2,0	23,9 ± 6,0	88,0 ± 7,8	29,2 ± 3,0	33,2 ± 1,7	358.053 ± 166,986
AT + TT (97)	14.760 ± 4,8	2,6 ± 0,5	7,7 ± 1,1	23,2 ± 3,6	89,2 ± 8,3	29,7 ± 3,6	33,2 ± 2,1	447.052 ± 136,941
Valor P								0,040 *

LEUCO - N^o Leucócitos (uL); HM - Hemácias (x 1000000/uL); HG - Hemoglobina (g/dL); HT - Hematócrito (%); VCM - Volume corpuscular médio (fl); HCM - Hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL); PLA - Plaquetas (uL); VR - Valores de Referência

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

6.8. Associação entre os polimorfismos em moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias com os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S e talassemia alfa.

Os resultados demonstraram ausência de associação estatística entre os polimorfismos gênicos, os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S e a talassemia alfa deleção 3.7 Kb.

6.9. Associação entre o polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa, -251 na região promotora do gene da IL-8 e valores séricos de TNF-alfa e IL-8.

Os resultados demonstraram que não houve associação estatística entre a presença dos polimorfismos e os níveis séricos de TNF-alfa e IL-8 realizados em 82 e 83 pacientes com anemia falciforme, respectivamente, (tabela 15). Além disso, não houve associação estatística quando realizada a comparação entre as manifestações clínicas e os níveis séricos de TNF-alfa e IL-8 (tabela 16).

Tabela 15 – Correlação entre os polimorfismos no gene do TNF-alfa e IL-8 com os níveis séricos de TNF-alfa e IL-8 em pacientes pediátricos portadores de anemia falciforme de Salvador-Bahia.

POLIMORFISMOS PACIENTES Nº ()	NÍVEIS SÉRICOS TNF- alfa pg /mL (82) / IL-8 pg/mL (83)
TNF – alfa -308 GG (61)	37.0 ± 12.6
TNF – alfa -308 GA + AA (21)	41.2 ± 24.2
Valor de P	** 0.98304
TOTAL 82 PACIENTES	
IL-8 - 251 AA (10)	7.80 ± 6.1
IL-8 - 251 AT + TT (73)	10.55 ± 13.9
Valor de P	** 0.76358
TOTAL 83 PACIENTES	

* ANOVA ** KRUSKAL-WALLIS

Tabela 16 – Correlação entre os níveis séricos do TNF-alfa, IL-8 e os eventos clínicos apresentados pelos pacientes pediátricos com anemia falciforme de Salvador-Bahia.

Nº PACIENTES ()	NÍVEIS SÉRICOS DE TNF- alfa (82)	NÍVEIS SÉRICOS DE IL-8 (83)
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS		
Nº DE VASO-OCCLUSÃO		
≥ 1 < 4 EVENTO	(37/82) 35.7 ± 8,7	(37/70) 10.1 ± 8,4
≥ 4 EVENTOS	(45/82) 39.9 ± 20,5	(30/70) 7.8 ± 6,4
Nº AVC		
1 EVENTO	(4/7) 31.7 ± 3,6	(4/6) 6.5 ± 3,9
2 EVENTOS	(3/7) 34,1 ± 4,7	(2/6) 6.5 ± 0,07
Nº SEQÜESTRO ESPLÊNICO		
1 EVENTO	(5/11) 48.2 ± 29,1	(4/10) 6.6 ± 2,8
> 1 EVENTO	(6/11) 32.9 ± 2,0	(6/10) 5.0 ± 4,9
Nº INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR		
1 EVENTO	(10/14) 45.7 ± 31,2	(14/19) 2.1 ± 0,6
> 1 EVENTO	(4/14) 33.5 ± 7,0	(5/19) 2.4 ± 0,9
Nº PNEUMONIA		
1 EVENTO	(18/46) 37.4 ± 16,6	(17/45) 7.5 ± 6,9
> 1 EVENTO	(28/46) 35.2 ± 8,5	(28/45) 9.9 ± 7,2
TOTAL	82 PACIENTES	83 PACIENTES

Ausência de associação estatística entre os níveis séricos de TNF—alfa, IL-8 e os eventos clínicos estudados

Investigação do polimorfismo T833C no gene da VCAM-1

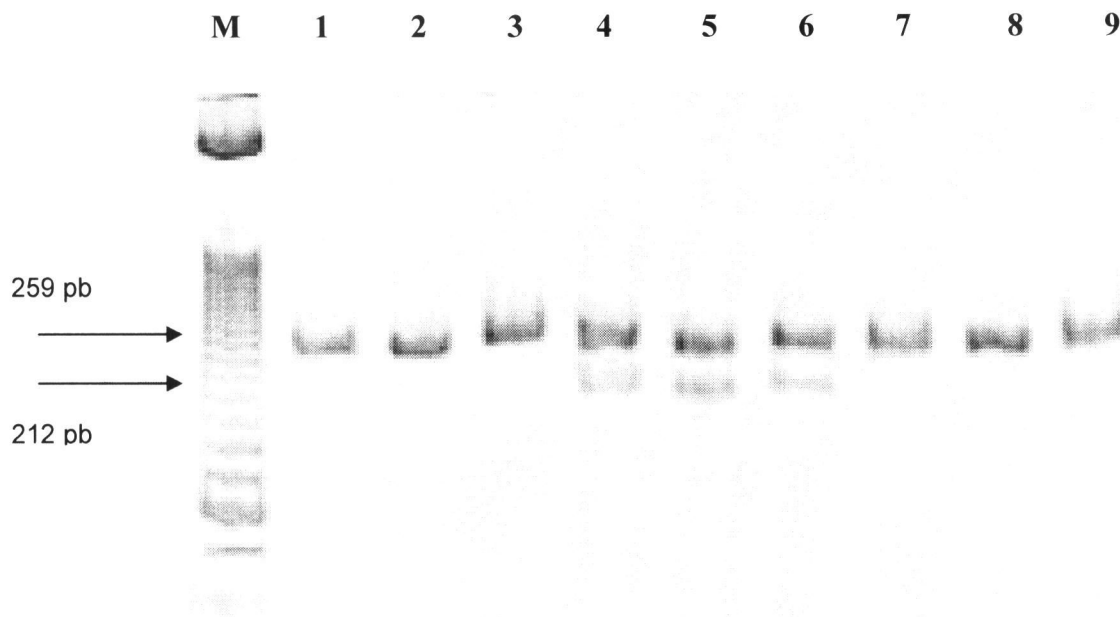


Figura 03 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo T833C da VCAM-1, utilizando a endonuclease de restrição *Rsa* I.

M = Marcador 25 pb

Linha 1-3 / 7-9 = Genótipo selvagem

Linha 4-6 = Genótipo heterozigoto

Investigação do polimorfismo G1238C no gene da VCAM-1

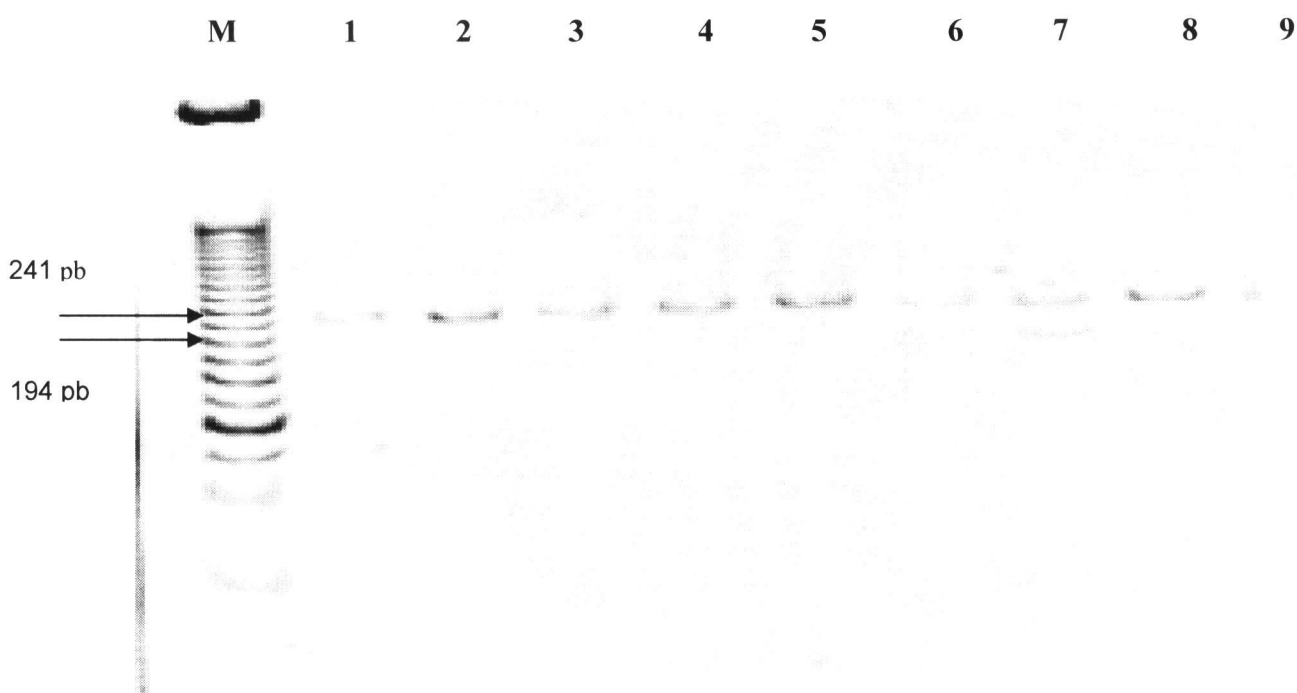


Figura 04 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo G1238C da VCAM-1, utilizando a endonuclease de restrição *Cac 8I*.

M = Marcador 25 pb

Linha 1-5 / 8-9 = Genótipo selvagem

Linha 6-7 = Genótipo heterozigoto

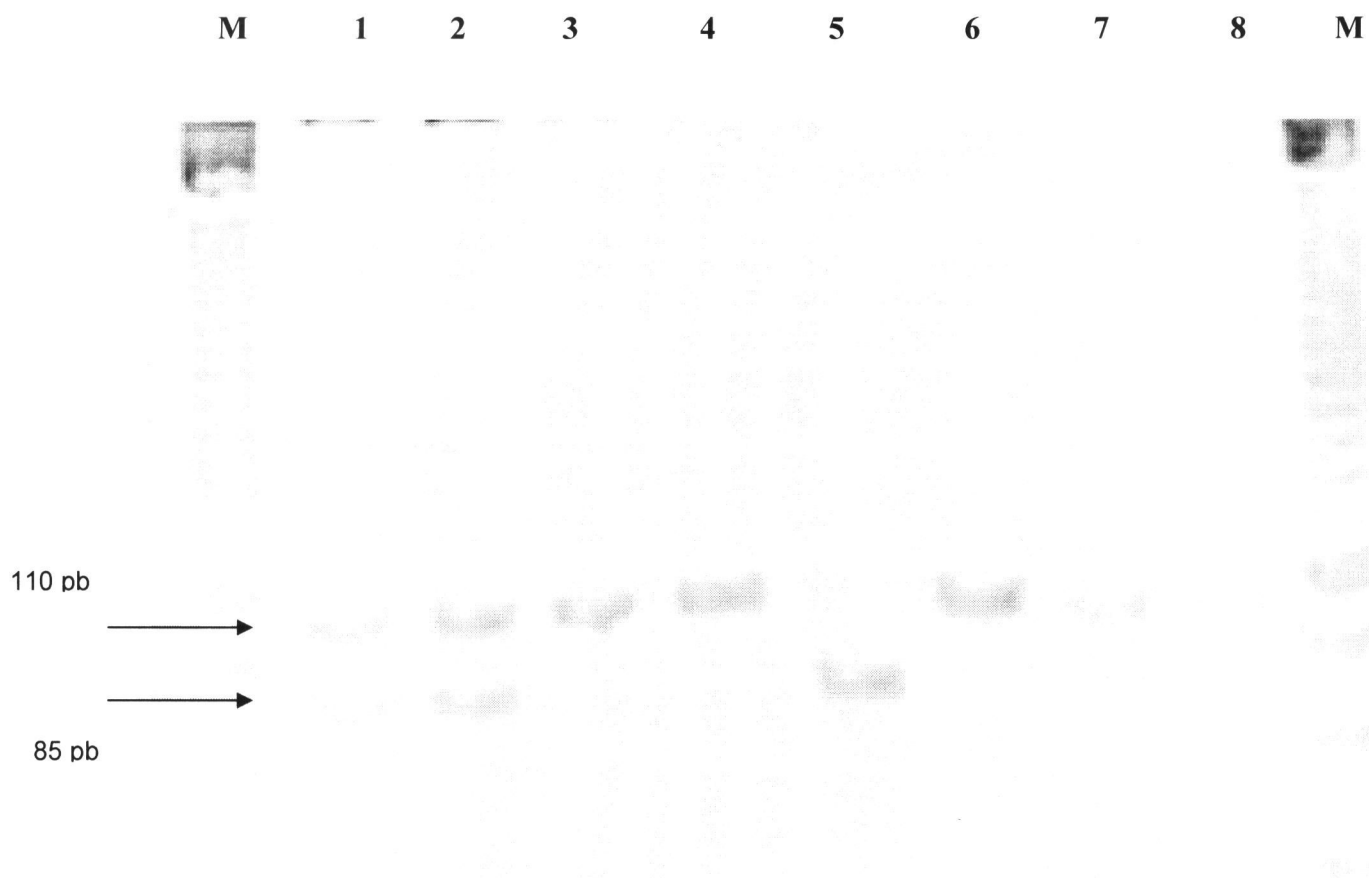
Investigação do polimorfismo A469G no gene da ICAM-1

Figura 05 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo A469G da ICAM-1, utilizando a endonuclease de restrição *Bst* UI.

M = Marcador 25 pb

Linha 3-4 / 6 / 8 = Genótipo selvagem

Linha 1-2 / 7 = Genótipo heterozigoto

Linha 5 = Genótipo homozigoto

Investigação do polimorfismo G308A no gene do TNF-alfa

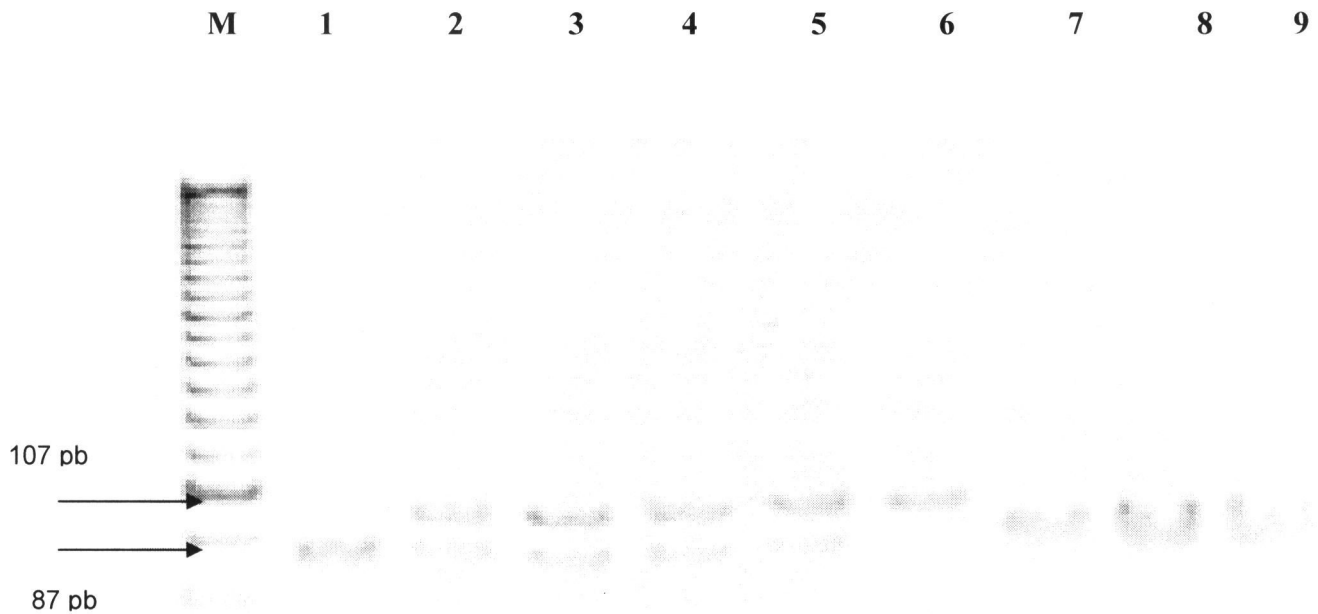


Figura 06 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo G308A do TNF-alfa, utilizando a endonuclease de restrição *Nco* I.

M = Marcador 25 pb

Linha 1 / 7-9 = Genótipo selvagem

Linha 2-5 = Genótipo heterozigoto

Linha 6 = Genótipo homozigoto

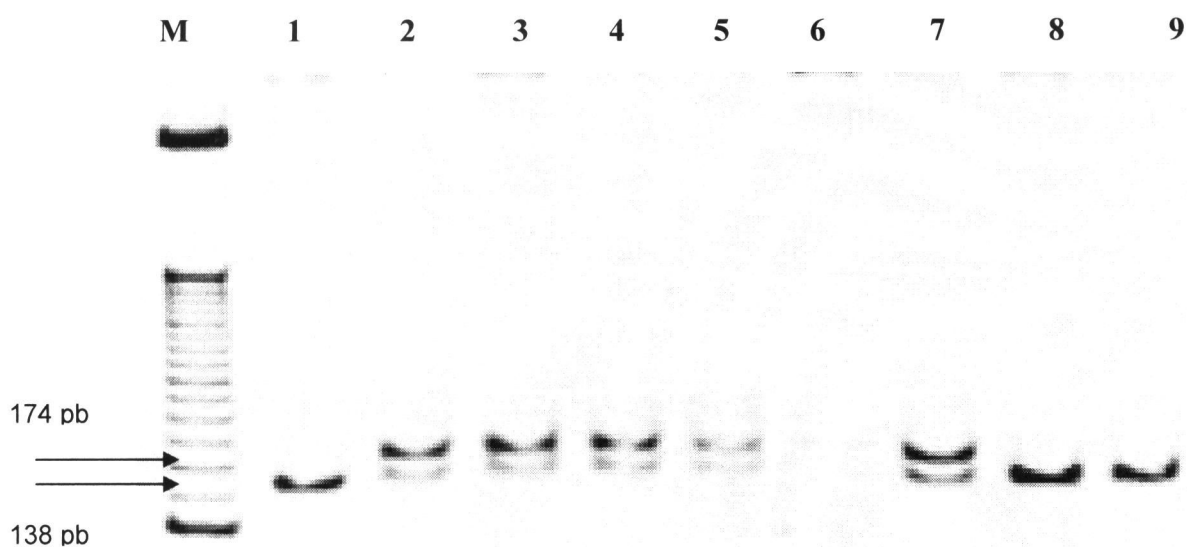
Investigação do polimorfismo A251T no gene da IL-8

Figura 07 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos da digestão do produto da reação de PCR para o polimorfismo A251T da IL-8, utilizando a endonuclease de restrição Ase I.

M = Marcador 25 pb

Linha 6 = Genótipo selvagem

Linha 2-5 / 7 = Genótipo heterozigoto

Linha 1 / 8-9 = Genótipo homozigoto

7. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é a doença genética mais prevalente no Brasil afetando cerca de 0,1-0,3% da população (NETO; PITOMBEIRA, 2003 ; DI NUZZO; FONSECA, 2004). Esta doença surgiu nos países do centro-oeste africano, da Índia e no leste da Ásia, há cerca de 50 a 100 mil anos, sendo a primeira descrição realizada na literatura médica em 1917 (NETO; PITOMBEIRA, 2003). A Bahia, em decorrência do grau elevado de miscigenação racial da população e o histórico de imigração de um grande contingente de africanos no século passado, possui frequência de 7,4% - 15,7% para os heterozigotos AS em grupos específicos da população (AZEVEDO *et al.*, 1980).

As manifestações clínicas observadas na anemia falciforme são decorrentes da circulação inadequada dos eritrócitos falcizados, ocasionando obstrução da microcirculação e destruição prematura destes eritrócitos. Estas manifestações podem ser iniciadas a partir dos três meses de vida, mas de forma branda, devido a presença de concentrações elevadas de hemoglobina fetal neste período (DI NUZZO; FONSECA, 2004).

O mortalidade entre portadores de anemia falciforme em idade pediátrica abaixo dos 5 anos está entre 25 e 30% e a maioria das mortes tem como causa infecções fatais e eventos de seqüestro esplênico (DI NUZZO; FONSECA, 2004).

Os dados relativos às manifestações clínicas apresentados no nosso estudo, quando estratificados por faixa etária, evidenciaram que entre 5-9 anos os eventos de seqüestro esplênico foram mais comuns do que nas outras idades, sendo que dos 39 pacientes, 11 (28,2%) apresentaram eventos de seqüestro esplênico ($p= 0,00304$). Esses dados são diferentes dos descritos por Lanzkowsky (1995) e Di nuzzo; Fonseca (2004) que demonstram que os eventos de seqüestro esplênico acometem em maior frequência os portadores de anemia falciforme na faixa etária de 0-5 anos.

A Hb F é o modulador fenotípico mais importante e talvez o mais conhecido na anemia falciforme. Muitos estudos têm correlacionado níveis elevados de Hb F ao melhor prognóstico e diminuição de manifestações clínicas em pacientes (ODENHEIMER et al., 1987; PLATT et al., 1991; ZAGO *et al.*, 2004).

Os nossos resultados referentes aos níveis de hemoglobina fetal nos 125 pacientes investigados não apresentaram associação estatística entre o gênero, sendo dessa forma, discordantes dos apresentados por Steinberg et al. (1995) que correlacionaram níveis elevados de Hb F ao gênero feminino. Contudo, observamos correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e os parâmetros hematológicos, sendo que os pacientes que apresentaram hemoglobina fetal $\geq 10\%$ tiveram número mais elevado de hemácias ($2.7 \pm 0,6$; $p=0,03339$); valores de hemoglobina ($8.0 \pm 1,3$; $p=0,00135$) e concentração de hematócrito ($24.5 \pm 4,1$; $p=0,00076$) quando comparados aos pacientes com hemoglobina fetal $< 10\%$. Entretanto, esses resultados são diferentes dos apresentados por Falusi; Kulosik (1990) que descreveram ausência de associação entre os níveis de Hb F e os parâmetros hematológicos.

Os níveis de hemoglobina fetal não apresentaram correlação com as manifestações clínicas investigadas em nosso estudo, sendo concordantes com os apresentados por Odenheimer et al. (1987), que não associaram os níveis de hemoglobina fetal como preditores para crises de dor. Em contrapartida, o estudo de Platt et al. (1991) apresentou correlação entre o aumento do número de crises de dor e os níveis diminuídos de hemoglobina fetal. Além disso, o estudo realizado por Rahgozar et al. (2000) evidenciou que pacientes com anemia falciforme e hemoglobina fetal acima de 18% não apresentaram manifestações clínicas graves. Entretanto, o estudo realizado por Inati et al. (2003) demonstrou que níveis elevados de hemoglobina fetal estavam associados a casos clínicos graves entre portadores de anemia falciforme provenientes do Líbano.

No presente estudo não encontramos associação estatística entre os polimorfismos -833 e 1238 no gene da VCAM-1 ($p > 0,05$); -308 no gene do TNF-alfa ($p > 0,05$) e -251 no gene da IL-8 ($p > 0,05$) entre os pacientes com anemia falciforme quando comparados ao grupo de indivíduos da população. Não observamos diferenças estatísticas quando correlacionamos os polimorfismos investigados uns aos outros associando as manifestações clínicas estudadas.

O AVC é uma das principais complicações na anemia falciforme, sendo importante causa de morbidade e mortalidade, afetando cerca de 4,01% dos pacientes e apresentando frequência elevada em crianças e em adultos acima de 30 anos (OHENE *et al.*, 1998). Fatunde *et al.* (2005) ao estudar crianças nigerianas portadores de anemia falciforme observaram frequência de 5,4% para o AVC, sendo a idade média para o primeiro evento de 6,8 anos. No estudo de Taylor *et al.* (2002) foi observado que o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 atua como fator protetor para a ocorrência de AVC ($p= 0,02$). Entretanto, no nosso estudo não foram encontradas associações entre a presença do polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 e AVC. Desta forma, Jordam (2006) reforça que crianças com anemia falciforme devem ser cuidadosamente avaliadas para presença de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de AVC.

Os fenômenos vaso-oclusivos em pacientes com anemia falciforme são originados a partir da interação de hemácias falcizadas com o endotélio e possivelmente amplificados pela presença de leucócitos, plaquetas e reticulócitos. Esses eventos são consequência da alteração do tônus vascular, mudanças metabólicas, inflamação e infecção (STEINBERG *et al.*, 2001). Por exemplo, no estudo de Ergul *et al.* (2004) foram observados níveis elevados de endotelina-1, potente vaso-constrictor, nos pacientes com anemia falciforme e em crise vaso-oclusiva. Em outro estudo, foi observada a ativação de neutrófilos com expressão aumentada de moléculas de superfície nos pacientes em crise (LARD *et al.*, 1999). Outro aspecto envolvido nos eventos de vaso-oclusão é a disfunção de neutrófilos, que elevam o risco de infecção e

conseqüentemente de eventos de vaso-oclusão (LACHANT; OSEAS, 1987). No nosso estudo, observamos número elevado de eventos de vaso-oclusão nas quatro faixas etárias estudadas, sendo que crianças com 13-17 anos de idade apresentaram número elevado de eventos de vaso-oclusão ($p=0,01982$).

Além disso, quando realizada à comparação do polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 com o número de eventos de vaso-oclusão, observamos que os pacientes que possuíam o polimorfismo apresentaram um número maior de eventos de vaso-oclusão ($4,80 \pm 3,7$; $p=0,036$). Este dado pode estar associado a gravidade da doença, uma vez que entre os parâmetros hematológicos dos pacientes portadores do polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, observamos a diminuição do número de hemácias ($2.20 \pm 0,3$; $p=0,0021$); da concentração de hematócrito ($21.2 \pm 2,5$; $p=0,0229$) e aumento do valor do VCM ($94.9 \pm 8,1$; $p=0,0083$), o que pode ser interpretado como um aumento da anemia e também do número de reticulócitos.

Quando realizada a análise entre o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, níveis de Hb fetal e eventos de vaso-oclusão, observamos que os pacientes que apresentaram o polimorfismo, em heterozigose, junto com níveis de Hb fetal $< 10\%$ tiveram número maior de eventos de vaso-oclusão ($6.0 \pm 4,0$; $p=0,04$).

Na correlação entre o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, haplótipos do grupo de genes da globina beta S e eventos de vaso-oclusão, encontramos que os pacientes com o polimorfismo, em heterozigose, e o haplótipo CAR tiveram aumento no número de eventos de vaso-oclusão ($5.5 \pm 3,6$; $p=0,02$).

Baseado nos nossos achados, concluímos que a correlação entre o polimorfismo 1238 no gene de VCAM-1 com o aumento do número de eventos de vaso-oclusão e sua associação aos parâmetros hematológicos, níveis de hemoglobina fetal e presença do haplótipo CAR pode estar relacionada a efeitos epistáticos e a presença de desequilíbrio de ligação do gene na nossa população, já que não foram encontrados indivíduos homozigotos nos grupos estudados.

Ressaltamos que o gene VCAM-1 pode está desempenhando um papel importante como modificador genético do fenótipo apresentado por pacientes com anemia falciforme, possuindo influência direta nos níveis séricos de VCAM-1 semelhante ao descrito por Duits et al. (1996) e conseqüentemente no efeito de algumas citocinas específicas, como IL-13 (BOCHNER *et al.*, 1995). Desta forma, baseado no fato de que receptores de adesão direcionam uma enorme variedade de funções, tais como interação célula-célula, sinalização e tráfego de leucócitos e reconhecimento de células T (SPRINGER, 1995), e que a resposta imune gerada através destas interações podem estar protegendo ou agravando algumas patologias. Estudos clínicos adicionais, voltados para a participação destas moléculas como futuros alvos para novas terapias anti-inflamatórias devem ser realizados nesses pacientes, tendo como exemplo o estudo de Kaul et al. 2000 com o uso de anticorpos monoclonais, inibindo a interação entre eritrócitos falcizados e endotélio vascular.

O fator de necrose tumoral alfa é uma citocina pró-inflamatória classicamente produzida por monócitos / macrófagos, linfócitos T e B (WILSON *et al.*, 1997). No presente estudo, os pacientes pediátricos com anemia falciforme apresentaram níveis elevados de TNF-alfa sérico com média $38.1 \pm 16,3$, sendo o limite de detecção de 7.8 pg/mL. Os dados encontrados são condizentes com os apresentados por Malave et al. (1993) e Tavakkoli et al. (2004), que observaram o aumento do TNF-alfa sérico em pacientes portadores de anemia falciforme. Contudo, no estudo de Hibbert et al. (2005) não foi observada diferença estatística entre os níveis séricos do TNF-alfa em portadores de anemia falciforme e um grupo controle formado por indivíduos sadios. Além disso, no trabalho de Raghupathy et al. (2000) níveis séricos não detectáveis de TNF-alfa foram observados em crianças portadoras de anemia falciforme em estado estável.

Wilson et al. (1997) demonstrou, *in vitro*, que a presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa está associada à expressão aumentada dessa citocina. Em nosso estudo não

observamos associação entre a presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa e os níveis séricos dessa citocina em 82 pacientes pediátricos com anemia falciforme investigados ($p=0,98304$), apesar de que os pacientes com o polimorfismo apresentaram discreto aumento na concentração sérica do TNF-alfa.

Os dados relativos à presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa no estudo de Karahan et al. (2005) em um grupo de pacientes pediátricos com AVC, demonstraram a ausência de associação quando comparado a um grupo controle. Além disso, no estudo realizado por Hoppe et al. (2001), desenvolvido em 69 portadores de anemia falciforme não foi encontrada associação entre o polimorfismo -308 e eventos de AVC. Esses resultados são condizentes com os que obtivemos no grupo de pacientes incluídos no nosso estudo, não encontrando associação entre a presença do polimorfismo e os eventos de AVC. Entretanto, no estudo realizado por Hoppe et al. (2004) em pacientes portadores de anemia falciforme com o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa, foi descrita ocorrência menor de AVC ($p=0,048$). Além desses dados, previamente publicados, não encontramos associação estatística entre a presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa e as demais manifestações clínicas descritas na anemia falciforme. Entretanto, encontramos um número elevado de eventos de seqüestro esplênico entre os portadores do polimorfismo ($0,50 \pm 1,1$; $p=0,048$). Desta forma, estudos adicionais devem ser realizados visando caracterizar o polimorfismo -308 na região promotora do gene do TNF-alfa como possível fator de risco para o desenvolvimento de eventos de seqüestro esplênico, juntamente com fatores de risco classicamente descritos, como número elevado de hemácias irreversivelmente falcizadas e níveis diminuídos de hemoglobina fetal (WILSON-OKOL, *et al.*, 2006).

Quando realizada a análise entre o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa, haplótipos do grupo de genes da globina beta S e eventos de seqüestro esplênico, encontramos que os pacientes que apresentaram o polimorfismo -308, em heterozigose ou homozigose, e o

haplótipo CAR tiveram aumento no número de eventos de seqüestro esplênico ($0.6 \pm 1,2$; $p=0,03$).

Os nossos resultados demonstraram que a presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa está associada ao aumento do número de hemácias ($2.9 \pm 0,6$; $p=0,01$); diminuição do VCM ($84.6 \pm 9,2$; $p=0,0085$) e diminuição do HCM ($27.9 \pm 9,2$; $p=0,0048$), dados que podem estar correlacionados a presença do polimorfismo a mudanças fenotípicas, ainda não esclarecidas neste grupo de pacientes.

No estudo de Okpala et al. (2002) foi observado a contribuição da leucocitose para a gravidade de manifestações clínicas na anemia falciforme. Os leucócitos contribuem para essa gravidade pela capacidade de adesão aos vasos sanguíneos, adesão a outras células presentes no sangue, estímulo a expressão de moléculas de adesão, dano tecidual e reações inflamatórias, culminando no bloqueio efetivo do lúmen vascular (OKPALA, 2004). No estudo Okpala et al. (2002) observaram que o aumento na expressão de moléculas de adesão em leucócitos de pacientes com anemia falciforme está associado à elevação das complicações renais ($p=0,018$) e AVC ($p=0,03$). Em nosso estudo não foram observadas diferenças estatísticas quando comparado o número de leucócitos, possível fator de risco, e as manifestações clínicas em diferentes faixas etárias. Em contrapartida no estudo de OHENE et al. (1998) observaram que o aumento na contagem de leucócitos estava associado à elevação do risco para o desenvolvimento de AVC ($p=0,026$).

A ICAM-1 possui papel crucial na migração e ativação de linfócitos, sendo considerado importante em doenças que possuem caráter inflamatório como a arteriosclerose (GEATANI *et al.*, 2002). Geatani et al. (2002) descreveram a presença em homozigose do polimorfismo 469 no gene da ICAM-1 como fator de risco para a doença arterial obstrutiva. Pola et al. (2003) encontraram uma associação desse polimorfismo em homozigose e a história de AVC isquêmico. No nosso estudo, o polimorfismo 469 no gene da ICAM-1 não apresentou

associação com as manifestações clínicas avaliadas em portadores de anemia falciforme. Entretanto, a presença do polimorfismo apresentou associação com a diminuição do nível de hemoglobina ($7.4 \pm 1,1$; $p= 0,0324$), podendo ser caracterizado como possível fator prognóstico, em virtude da correlação existente entre níveis diminuídos de hemoglobina e a gravidade da doença (BALLAS; SMITH, 1992).

A IL-8 é um membro da família das quimiocinas e é o principal envolvido na iniciação e amplificação de reações inflamatórias agudas e crônicas. Heinzmann et al. (2004) observaram que o polimorfismo -251 é mais freqüente em crianças que apresentam artrite e asma. No estudo de Arinir et al. (2005) não foi observada associação entre a presença do polimorfismo -251 no gene da IL-8 e a doença pulmonar obstrutiva. Em nosso estudo não observamos associação entre o polimorfismo -251 e as manifestações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. Além disso, não encontramos associação entre o polimorfismo e concentração sérica da IL-8 ($p=0,76358$), apesar dos portadores do polimorfismo terem apresentado discreto aumento de 3.75 pg/mL na concentração sérica dessa quimiocina.

Etienne-Julan et al. (2004) observaram que os pacientes com anemia falciforme apresentaram níveis diminuídos de IL-8 em estado estável e níveis elevados nos episódios de crises vaso-oclusivas. Dados similares foram encontrados no estudo de Duits et al. (1998), que observaram níveis elevados de IL-8 no início e no decorrer dos eventos de vaso-oclusão. Em outro estudo, Gonçalves et al. (2001) demonstraram que pacientes com anemia falciforme em crise vaso-oclusiva apresentaram níveis elevados de IL-8 e níveis diminuídos em estado estável da doença. Essa correlação entre níveis elevados de IL-8 e crises de vaso-oclusão pode ser explicada pelo aumento na expressão de MAC-1 na superfície de neutrófilos frente a estímulo de IL-8 *in vitro* (ASSIS *et al.*, 2005). Desse modo, nossos resultados são condizentes com estes estudos, em que observamos níveis diminuídos de IL-8 ($10,216 \pm 13,2$; $p=0,76358$) e ausência

de associação com às manifestações clínicas em 83 pacientes pediátricos com anemia falciforme em estado estável da doença.

O papel das plaquetas nas manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme ainda é pouco estabelecido. Papadimitrion et al. (1993) observaram aumento da atividade plaquetária em pacientes com anemia falciforme em estado estável e em crise de vaso-oclusão quando comparado a um grupo controle normal, sugerindo uma possível participação das plaquetas nas manifestações clínicas. Em outro estudo, realizado por Amin et al. (2004) observaram que pacientes com anemia falciforme em crise de vaso-oclusão apresentaram aumento do PDW (*Platelet Distribution Width*) com possível associação à qualidade funcional das plaquetas, sem aumento numérico. No nosso estudo observamos que os pacientes que apresentaram o polimorfismo -251 no gene da IL-8 tiveram número elevado de plaquetas ($447.052 \pm 136,94$; $p= 0,04$). Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para confirmar se a presença do polimorfismo pode ser caracterizada como possível fator de risco para manifestações clínicas na anemia falciforme, pelo fato de que as plaquetas juntamente com leucócitos e hemácias falcizadas estão possivelmente envolvidos de maneira conjunta nos eventos de vaso-oclusão (NAGEL; STUART, 2004).

Em conjunto, os resultados apresentados neste estudo devem ser analisados levando-se em conta a associação dos marcadores genéticos versus fatores ambientais e sócio-econômicos, de maneira que possamos obter informações fidedignas sobre a história natural da anemia falciforme na nossa população, contribuindo para a melhoria do acompanhamento clínico desses pacientes.

Estamos conscientes da necessidade de estudos adicionais voltados para a avaliação de mecanismos envolvidos nesses processos, de maneira que possamos confirmar os nossos achados, convertendo-os em benefício para estes indivíduos.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos do nosso estudo concluímos:

- 1- As freqüências descritas para os polimorfismos -833, 1238 no gene da VCAM-1; -308 no gene do TNF-alfa e -251 no gene da IL-8 não apresentaram diferença entre o grupo de pacientes com anemia falciforme e o grupo populacional;
- 2- Os eventos de vaso-oclusão foram mais freqüentes na faixa etária de 13-17 anos e os eventos de seqüestro esplênico na faixa etária de 5-9 anos;
- 3- A presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa, -251 no gene da IL-8 não influenciaram na concentração sérica do TNF-alfa e da IL-8;
- 4- Encontramos associação entre a presença do polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 e o número de eventos de vaso-oclusão;
- 5- Encontramos associação entre a presença do polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa e o número de eventos de seqüestro esplênico;
- 6- Encontramos associação entre a presença do polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1 e o número de hemácias, hematócrito e VCM;
- 7- Encontramos associação entre o polimorfismo 469 no gene da ICAM-1 com a concentração de hemoglobina;
- 8- Encontramos associação entre o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa com o número de hemácias, VCM e HCM;
- 9- Encontramos associação entre o polimorfismo -251 no gene da IL-8 com o número de plaquetas;

- 10- Observamos que os pacientes que apresentaram o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, junto com níveis de Hb fetal < 10% tiveram número maior de eventos de vaso-oclusão;
- 11- Observamos que os pacientes que apresentaram o polimorfismo 1238 no gene da VCAM-1, junto com o haplótipo CAR tiveram número maior de eventos de vaso-oclusão;
- 12- Observamos que os pacientes que apresentaram o polimorfismo -308 no gene do TNF-alfa, junto com o haplótipo CAR tiveram número aumentado de eventos de seqüestro esplênico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T. G.; SNIEDER, H.; MCKIE, C. V.; CLAIR, B.; BRAMBILLA, D.; ADAMS, J. R.; KUTLAR, F.; KUTLAR, A. Genetic risk factors for cerebrovascular disease in children with sickle cell disease: design of a case-control association study and genomewide screen. **BMC Med. Genet.**, v. 4, p. 6, 2003.
- 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.**, v. 21, p. 292-296, 2005.
- ADORNO, E. V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SOUZA, C. C.; SANTOS, L. F.; MENEZES, J. F.; DUPUIT, M. F.; ALMEIDA, M. N.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin**, v. 28, p. 267-271, 2004.
- AHN, H.; LI, S. C.; WANG, W. Sickle cell hepatopathy: Clinical presentation, treatment and outcome in pediatric and adult patients. **Pediatr. Blood Cancer.**, v. 45, p. 184-190, 2005.
- ANIE, K. Psychological complications in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 129, p. 723-729, 2005.
- AMIN, A. M.; AMIN, A. P.; KULKARNI, R. H. Platelet distribution width (PDW) is increased in vaso occlusion crisis in sickle cell disease. **Ann. Hematol.**, v. 83, p. 331-335, 2004.
- ARINIR, U.; KLEIN, W.; ROHDE, G.; STEMMLER, S.; EPPLEN, T. J.; SCHULTZE-WERNINGHAUS, G. Polymorphisms in the interleukin-8 gene patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Electrophoresis**, v. 26, p. 2888-2891, 2005.
- ASSIS, A.; CONRAN, N.; CANALLI, A. A.; METZE, L. I.; SAAD, O. T. S.; COSTA, F. F. Effects of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol.**, v. 113, p. 130-136, 2005.

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.

BALLAS, S. K.; SMITH, E. D. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. **Blood**, v. 15, p. 2154-2163, 1992.

BOCHNER, B. S.; KLUNK, D. A.; STERBINSKY, S. A.; COFFMAN, R. L.; SCHLEIMER, R. P. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 154, p. 799-803, 1995.

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

CHEN, Y.; PFAB, T.; SLOWINSKI, T. Impact of genetic variation of tumor factor necrosis alpha on gestational hypertension. **Chin. Med. J.**, v. 119, p. 719-724, 2006.

CLARK, B. E.; THEIN, L. S. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, p. 159-176, 2004.

COOKE, S. G.; CAMPBELL, J. S.; FIELDING, K.; SILLAH, J.; MANNEH, K.; SIRUJO, G.; BENETT, S.; MCADAM, J. W. P. K.; LIENHORDT, C.; HILL, S. V. A. Interleukin-8 polymorphism is not associated with pulmonary tuberculosis in the gambia. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 1545-1546, 2004.

COX, D. G.; HANKINSON, E. S.; HUNTER, J., D. Polymorphisms in the ICAM-1 gene locus are not associated with breast cancer risk. **Canc. Epidemiol. Bio. Prevent.**, v. 1, p. 178-174, 2006.

DI NUZZO, P. V. D.; FONSECA, F. S. Sickle cell disease and infection. **J. Pediatric.**, v. 80, p. 347-354, 2004.

DOWNES, M. S.; HAMBLETON, R. I.; CHUANG, L. E.; LOIS, N.; SERJEANT, R. G.; BIRD, C. A. Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy. **Am. Acad. Ophthalmol.**, v. 112, p.1869-1875, 2005.

DUITS, A. J.; SCHNOG, J. B.; LARD, L. R.; SALEH, H. M.; ROGER, R. A. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. **Eur. J. Haematol.**, v. 61, p. 302-305, 1998.

DUITS, A. J.; PIETERS, A.; SALEH, E.; VAN ROSNALEN, E.; KATERBERG, H.; BEREND, K.; ROJER, A. R. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their specific increment during vasoocclusive crisis. **Clin. Immunol. Immunophatol.**, v. 81, p. 96-98, 1996.

ERGUL, S.; BRUNSON, C. Y.; HUTCHINSON, J.; TAWFIK, A.; KUTHER, A.; WEBB, R. C.; ERGUL, A. Vaso-active factor in sickle cell disease, in vitro, evidence for endothelin-1 mediate vasoconstriction. **Am. J. Hematol.**, v. 76, p. 245-251, 2004.

ETIENNE-JULAN, J. 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. 863-864, 2004.

FALUSI, A. G.; KULOZIK, A. E. Relationship of fetal haemoglobin levels and beta S haplotypes in homozygous sickle cell disease. **Eur. J. Haematol.**, v. 45, p. 1-4, 1990.

FATUNDE, O. J.; ADAMSON, F. G.; OGUNSEYINDE, O.; SODEINDE, O.; FAMILUSI, J. B. Stroke in nigerian children with sickle cell disease. **Am. J. Med. Sci.**, v. 34, p. 157-160, 2005.

FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; GONÇALVES, M. S.; ARRUDA, V. R.; SAAD, S. T.; SONATI, M. F.; STOMING, T.; COSTA, F. F. Effects of alpha-thalassemia and bete-globin

gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle cell anemia in Brazil. **Am. J. Hematol.**, v. 53, p. 72-76, 1996.

GEATANI, E.; FLEX, A.; POLA, R.; PAPALEO, P.; POLA, E.; FLORE, R.; SERRICCHIO, M.; GASBARRINI, A.; POLA, P. The K469E polymorphism of the ICAM-1 gene is a risk factor for peripheral arterial occlusive disease. **Blood**, v. 13, p. 483-488, 2002.

GONÇALVES, S. M.; QUEIROZ, L. I.; CARDOSO, A. S.; ZANNETI, A.; STRAPAZONI, C. A.; ADORNO, E.; ALBUQUERQUE, A.; SANTÁNA, A.; REIS, G. M.; BARRAL, A.; BARRAL, M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive markers in brazilian patients with sickle cell disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 1309-1313, 2001.

GONÇALVES, M. S.; BONFIM, G. C.; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I.; LYRA, I.; ZANETTE, A.; BONFIM, G.; ADORNO, E. V.; ALBUQUERQUE, A. L.; PONTES, A.; DUPUIT, M. F.; FERNANDES, G. B.; REIS, M. G. Beta S haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 1283-1288, 2003.

HEINZMANN, A.; AHLERT, I.; KURS, T.; BERNER, R.; DEICHMANN, A. K. Association study suggest opposite effects of polymorphisms within IL-8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. **J. All. Clin. Immunol.**, v. 114, p. 671-676, 2004.

HIBBERT, M. J.; HSU, L. L.; BHATHEMA, J. S.; IRUNE, I.; SARFO, B.; AL-MAHMOUD, A.; STILES, K. J. Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. **Exp. Biol. Med.**, v. 230, p. 68-74, 2005.

HOWELL, M. W.; PEAD, J. P.; SHEK, W. F.; ZERILLI, R. J. M.; ARMSTRONG, T.; JOHNSON, D. C.; FINE, R. D.; IREDALE, P. J.; BATEMAN, C. A. Influence of cytokine and ICAM-1 gene polymorphisms on susceptibility to chronic pancreatitis. **J. Clin. Pathol.**, v. 58, p. 595-599, 2005.

HOPPE, C.; KLITZ, W.; CHENG, S.; APPLE, R.; STEINER, L.; ROBLES, L.; GIRARD, T.; VICHINSKY, E.; STYLES, L. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 15, p. 2391-2396, 2004.

HOPPE, C.; KLITZ, W.; CHENG, S.; VICHINSKY, E.; STYLES, L.; GROW, M.; SILBERGLEIT, A.; TRACHTENBERG, E.; ERLICH, H. A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anemia. **Brit. J. Haematol.**, v. 114, p. 718-720, 2001.

HULL, J.; ACKERMAN, H.; ISLES, K.; USEN, S.; PINDER, M.; THOMSON, A.; KWIATKOWSKI, D. Unusual haplotypic structure of IL-8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. **Am. J. Human. Genetic.**, v. 69, p. 413-419, 2001.

INATI, A.; TAHER, A.; BOU ALAWI, W.; KOUSSA, S.; KASPAR, H.; SHBAKLO, H.; ZALLOUA, P. A. Beta-globin gene cluster haplotypes and Hb F levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. **Eur. J. Haematol.**, v. 70, p. 79-83, 2003.

JAE-YONG, U.; KIM, M. H. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms is associated with cerebral infarction. **Mol. Brain. Res.**, v. 122, p. 99-102, 2004.

JORDAM, L. C. Stroke in Childhood. **Neurologist**, v. 12, p. 94-102, 2006.

KARAHAN, C. Z.; DEDA, G.; SIPAHI, T.; ELHAN, H. A.; AKAR, N. TNF- α -308 G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. **Thromb. Res.**, v. 115, p. 393-398, 2005.

KAUL, D. K.; TSAI, H. M.; LIU, X. D.; NAKADA, M. T.; NAGEL, R. L.; COLLER, B. S. Monoclonal antibodies to α v β 3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interaction induced by platelet-activating factor. **Blood**, v. 95, p. 368-374, 2000.

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. 415-418, 2003.

LACHANT, N. A.; OSEAS, R. S. Vaso-occlusive crisis associated neutrophil dysfunction in patients with sickle cell disease. **Am. J. Med. Sci.**, v. 294, p. 253-257, 1987.

LANZKOWSKY, P. **Manual of pediatric hematology and oncology**. 2. ed. New York: Chuchill Livingstone, 1995.

LARD, L. R.; MUL, F. P.; HOOS, M.; ROOS, D.; DUITTS, A. J. Neutrophil activation in sickle cell disease. **J. Leu. Kol. Biol.**, v. 66, p. 411-415, 1999.

LEE, R. G.; FOERTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, F.; RODGERS, M. G. **Wintrobe's clinical hematology**. 10 ed. USA: Willians & Wilkins, 1999.

LEE, C. B.; AHN, Y. S.; DOO, K. H.; YIN, V. S.; LEE, J. H.; JIN, Y. S.; HOMG, J. S.; LEE, H. S.; KIN, D. S.; SEO, C. J.; LEEM, H. K.; CHUNG, H. J. Susceptibility for ischemic stroke in korean population is associated with polymorphisms of the interleukin-4 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha genes, but not the interleukin-B gene. **Neuroscience**, v. 357, p. 33-36, 2004.

LESPRIT, E.; LESPRIT, P. Infections bactériennes dans la drépanocytose. **La Rev. du Prat.**, v. 54, p. 1574-1577, 2004.

LONERGAN, F. G.; CLINE, B. D.; ABBONDANZO, L, S. Sickle cell anemia. **AFIP Arch.**, v. 21, p. 971-974, 2001.

LORENZI, T. F. **Atlas de hematologia: clinica hematológica ilustrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LONGONI, M.; GINSBACH-GRAND, C.; GRON, J. A.; GENIUS, J.; DEBETTE, S.; SCHWANINGER, C.; FERRARESE, C.; LICKY, C. The ICAM-1 K469E gene polymorphism is a risk factor for spontaneous cervical artery dissection. **Neurology**, v. 66, p. 1273-1275, 2006.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, p. 943-949, 2005.

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

MCGLINCHEY, P. G.; SPENCE, S. M.; PATTERSON, C. C.; ALLEN, R. A.; MURPHY, G.; BELTON, C.; MCKOWER, P. P. The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene K469E polymorphism is not associated with ischaemic heart disease: on investigation using family based tests of association. **Eur. J. Immunogen.**, v. 31, p. 201-206, 2004.

MALAVE, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVE, H.; ARENDS, T. Levels of tumor necrosis factor alpha / cachectin (TNF-alfa) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta. Haematol.**, v. 90, p. 172-176, 1993.

MCKIBBING, M.; CLARK, B.; LEE, H.; ISAACS, D. J.; GOOI, C. H.; MORRELL, J. H. No strong association between alleles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 receptor antagonist and corneal melting associated with systemic vasculitis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 84, p. 395-398, 2000.

NAGEL, R. L.; STEINBERG, M. H. Genetics of the beta S gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. **Disorders of hemoglobin – genetics, pathophysiology and clinical management.** New york, p.711-715, 2001.

NAGEL, R.; STUART, M. Sickle cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

NETO, G. C. G.; PITOMBEIRA, S. M. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 51-56, 2003.

NEWCOMBE, P. Pathophysiology of sickle cell disease crisis. **Emerg. Nurse.**, v. 9, p. 19-22, 2002.

NIETERT, J. P.; SILVERSTEIN, D. M.; ABOUD, R. M. Sickle cell anemia; epidemiologia and cost of illness. **Pharmacoeconomics**, v. 20, p. 357-364, 2002.

ODENHEIMER, D. J.; SARNAIK, S. A.; WHITTEN, C. F.; RUCKNAGEL, D. L.; SING, C. F. The relationship between fetal hemoglobin and disease severity in children with sickle cell anemia. **Am. J. Med. Genet.**, v. 27, p. 525-535, 1987.

OHENE, R. F. K.; WEINE, S. J.; SLEEPER, L. A.; MILLER, T. S.; EMBURY, S.; MOOHR, W. J.; WETHERS, L. D.; PEGELOW, H. C.; GILLM F. F. Cerebro-vascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, v. 91, p. 288-294, 1998.

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. **Eur. J. Haematol.**, v. 69, p. 135-144, 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.

OSBORN, L.; VASSALO, C.; BENJAMIN, C. D. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternatively spliced domains of vascular cell adhesion molecule-1. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 99-107, 1992.

PAPADIMITRION, C. A.; TRAVLAN, A.; KALOS, A.; DORATSOS, D.; LALI, P. Study of platelet function in patients with sickle cell anemia during steady state and vaso occlusive crisis. **Acta. Haematol.**, v. 89, p. 180-183, 1993.

PATHARE, A.; KINDI, A. S.; DAAR, S.; DENNISON, D. Cytokines in sickle cel disease. **Healthscience**, v. 8, p. 329-337, 2003.

PLATT, O. S.; THORINGTON, B. D.; BRAMBILLA, D. J.; MILNER, P. F.; ROSSE, W. F.; VICHINSKY, E.; KINNEY, T. R. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 1747-1748, 1991.

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

POLA, R.; FLEX, A.; GEATANI, E.; FLORE, R.; SERRICCHIO, M.; POLA, A. Synergistic effects of -174 G/C polymorphism of interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. **Stroke**, v. 34, p. 881-885, 2003.

PUTHATHU, B.; KRUEGER, M.; HEINZE, S.; FOSTER, J.; HEIZMANN, A. Impact of IL-8 and IL-8 RA receptor alpha polymorphisms on the genetics bronchial asthma and severe RSV infection. **Clin. Mol. Allerg.**, v. 4, p. 1-6, 2006.

RAMALHO, A. S. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. **Soc. Braz. Genetic.**, v. 1, p. 160, 1986.

RAGHUPATHY, R.; HAIDER, M. Z.; AZIZIEH, F.; D'SOUZA, T. M.; ABDELSALAM, R.; ADEKIL, A. D. Tumor necrosis factor alpha is undetectable in the plasma of SS patients with elevated Hb F. **Am. J. Hematol.**, v. 64, p. 91-94, 2000.

RAHGOZAR, S.; POORFATHOLLAN, A. A.; MOAFI, A. R.; OLD, J. M. Beta S gene Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **Am. J. Hematol.**, v. 65, p. 192-195, 2000.

RODGERS, G. P.; SCHECHTER, A. N.; NAGUCHI, C. T.; KLEIN, H. G.; NIENHUSIS, A. W.; BAMER, R. F. Periodic microcirculatory flow in patients with sickle cell disease. **New Engl. J. Med.**, v. 311, p. 1534-1538, 1984.

ROSS, A. O.; NEILL, O. C.; REA, M.; LYNCH, T.; GOSAL, D.; WALLACE, A.; CURRAN, D. M.; MIDDLETON, D.; GIBSON, M. J. Functional promoter region polymorphism of the proinflammatory chemokine IL-8 gene associates with Parkinson's Disease in the Irish. **Human. Immunol.**, v. 65, p. 340-346, 2004.

SARNAIK, S. A. Thalassemia and related hemoglobinopathies. **Ind. J. Pediatr.**, v. 72, p. 319-324, 2005.

SCHNOG, B. J.; DITS, A. J.; MUSKIET, F. A.; TEN CATE, H.; BRANJES, D. D. Sickle cell disease; a general overview. **Neth. J. Med.**, v. 62, p. 364-374, 2004.

SEITZER, U.; SWIDER, C.; STUMBER, F.; SUCHNICKI, K.; LANGE, A.; RICHTER, E.; ZABEL, P.; MULLER, Q. J.; FLAD, H. D.; GERDES, J. Tumor necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. **Cytokine**, v. 9, p. 787-790, 1997.

SHAH, A. Hemoglobinopathies and others congenital hemolytic anemia. **Ind. J. Med. Sci.**, v. 58, p. 490-494, 2004a.

SHAH, A. Thalassemia syndromes. **Ind. J. Med. Sci.**, v. 58, p. 445-449, 2004b.

SHIU, T. Y.; UDDEN, M. M.; MCINTIRE, V. L. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in culture human endothelial cells. **Blood**, v. 95, p. 3232-3239, 2000.

SNAUSSI, K.; MAHJOUHD, W.; BAUANIMA, N.; AHMED, B. S.; HELOL, N. A.; CHAUCHANE, L. Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. **Hum. Immunol.**, v. 67, p. 13-21, 2006.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 827-872, 1995.

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

STEINBERG, H. M.; BUCHANAN, G. R.; DEBAUN, M. R.; QUINN, C. T. Sickle cell disease. **Am. Soc. Hematol.**, v. 1, p. 35-47, 2004.

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

STEINBERG, H. M.; HSU, H.; NAGEL, R. L.; MILNER, P. F.; ADAMS, J. G.; BENJAMIN, L.; FRYD, S.; GILLETE, P.; GILMAN, J.; JOSIFOVSKA, O. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **Am. Soc. Hematol.**, v. 48, p. 175-181, 1995.

TAVAKKOLI, F.; NAHAVANDI, M.; WYCHE, Q. M.; PERLIN, E. Plasma levels of TNF-alfa sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Hematology**, v. 9, p. 61-64, 2004.

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.

VENTO, S.; CAINELLI, F.; CESARIO, F. Infections and thalassaemia. **Lancet**, v. 6, p. 226-233, 2006.

VIGANO, P.; INFANTINO, M.; LAULETTA, R.; PONTI, E.; SOMIGLIANA, E.; VIGNALI, M.; DIBLASIO, M. A. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in endometriosis. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 9, p. 47-52, 2003.

WAGNER, C. M.; ECKMAN, R. J.; WICK, M. T. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 144, p. 260-266, 2004.

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.

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

WILSON-OKOL, D. A.; NWANCHE, C. A.; EJELE, O, A. Splenic changes in sickle cell anemia. **Niger. J. Med.**, v. 15, p. 20-23, 2006.

YAMASHITA, M.; YOSHIDA, S.; KENNEDY, S.; OHARA, N.; MOTOYAMA, S.; MARUO, T. Association study of endometriosis and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene polymorphisms in japanese population. **J. Soc. Gynecol. Investig.**, v. 12, p. 267-271, 2005.

YEDGAR, S.; KOSHKARYEV, A.; BARSHEIN, G. The red blood cell in vascular occlusion. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 32, p. 263-268, 2002.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, P. R.; PASQUINI, R. **Hematologia, fundamento e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZHANG, D.; LI, S. J.; JIANG, W. Z.; YU, J. B.; TANG, M. X.; ZHENG, M. H. Association of two polymorphisms of tumor necrosis factor gene with acute biliary pancreatitis. **World. J. Gastroenterol.**, v. 4, p. 824-828, 2003.

ANEXO-1

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, com 18 anos de idade ou mais, responsável por _____, portador de plena saúde mental, autorizo sua participação como voluntário na pesquisa sobre “Anemia falciforme: polimorfismos gênicos em moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), TNF-alfa, IL-8 e alterações fenotípicas” sob a coordenação de Dra. Marilda de Souza Gonçalves.

Nessa pesquisa serão investigados pacientes com anemia falciforme, alteração que muda a forma das células vermelhas que ficam menos deformáveis e que grudam nas veias juntamente com as células brancas participando das crises de dor, derrame, problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões.

Para isto será realizado um questionário sobre a história da doença que será respondida pelo médico que assiste o paciente e por busca no prontuário. Para participar do estudo será retirado 10 mL de sangue utilizando material descartável e estéril sendo que este procedimento não implicará em danos, devendo o paciente sentir uma ligeira picada da agulha. A região onde o sangue será retirado também poderá ficar temporariamente avermelhada. O sangue retirado será destinado ao estudo do DNA de algumas substâncias que ajudam na ligação das células às veias, visando identificar a sua participação nas crises e alterações presentes na anemia falciforme.

As implicações da minha participação neste estudo, incluindo a natureza, duração, objetivo, métodos e meios através dos quais deve ser conduzido, bem como a ausência de riscos foram explicados pelo investigador (a) na HEMOBA.

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento retirar o meu consentimento e deixando o menor de participar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos ao acompanhamento médico. Entretanto, exames adicionais poderão ser solicitados caso o médico que o assiste julgue-os necessários para a sua saúde e bem estar. A minha recusa em autorizar a participação do menor no estudo não resultará em punições ou perdas dos benefícios aos quais ele já tem direito.

Autorizo que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em análises futuras, desde que os estudos adicionais sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde e possam contribuir para novos conhecimentos relacionados à doença.

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida ao responsável de formular perguntas, testemunho a assinatura deste documento e receberei uma cópia do presente termo.

Assinatura da testemunha 1 _____
Assinatura da testemunha 2 _____

Assinatura do investigador _____

Data ____ / ____ / ____

Nome do investigador: Dra. Marilda de Souza Gonçalves

RESPONSÁVEIS PELO ESTUDO:

Dra Marilda Gonçalves
Bruno Cerqueira

LOCAL DA PESQUISA:

Laboratórios de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

TELEFONE PARA CONTATO:

31762226 ou 31762265

