

# IL-8 E TNF-ALFA: MARCADORES IMUNOLÓGICOS NO PROGNÓSTICO DA ANEMIA FALCIFORME

## IL-8 AND TNF-ALPHA: IMMUNOLOGICAL MARKERS IN SICKLE CELL ANEMIA PROGNOSTIC

Cyntia S. Cajado, Bruno A. V. Cerqueira, Cynara G. Barbosa, Isa Menezes Lyra, Elisângela V. Adorno, Marilda S. Gonçalves

Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil; Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil; Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA); Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

A hemoglobina S (HbS) possui frequência elevada no Brasil, sendo a Bahia o Estado com maior incidência da doença falciforme. A doença falciforme possui quadro clínico heterogêneo, caracterizado por episódios de vaso-oclusão e eventos infecciosos, aspectos que contribuem para a condição pró-inflamatória crônica descrita entre os seus portadores. O objetivo desse estudo foi investigar aspectos imunológicos e fenotípicos em indivíduos com anemia falciforme provenientes de Salvador, Bahia. O estudo foi desenvolvido em 126 pacientes, sendo 103 em estado clínico estável da doença e 23 hospitalizados por vaso-oclusão e/ou infecção. Foram investigados os polimorfismos -251T>A e -308G>A, localizados respectivamente nos genes da *IL-8* e do *TNF-alfa*, por PCR e PCR-RFLP; os níveis séricos da *IL-8* foram detectados por ELISA e a história clínica dos pacientes foi obtida dos prontuários médicos. Houve associação entre a presença do alelo mutante para o polimorfismo -308G>A e a ocorrência de sequestro esplênico ( $p < 0,05$ ). Interessantemente, os níveis séricos de *IL-8* foram  $32,3 \pm 43,3$  pg/ml no grupo de pacientes em crise permanecendo elevados após a alta hospitalar, diminuindo gradualmente. O alelo A do polimorfismo -251 foi associado aos níveis elevados de *IL-8*, independente do fator indutor. Juntos, nossos resultados mostraram a importância da interação dos marcadores de prognóstico no monitoramento dos portadores com anemia falciforme e a participação da *IL-8* no processo de vaso-oclusão. Estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel dos níveis de *IL-8* e de *TNF-alfa*, bem como a presença de polimorfismos nesses genes, visando a sua utilização como marcadores de prognóstico no acompanhamento clínico desses indivíduos.

**Palavras-chave:** citocinas, prognóstico, anemia falciforme.

*Hemoglobin S (HbS) has a high prevalence in Brazil, the Bahia state with the highest incidence of sickle cell disease. Sickle cell disease is a clinical heterogeneous conditions characterized by episodes of vaso-occlusion and infectious events, aspects that contribute to the pro-inflammatory chronic state described among its carriers. The aim of this study was to investigate phenotypic and immunological aspects of patients with sickle cell anemia from Salvador, Bahia. The study was conducted in 126 patients, 103 in steady-state of the disease and 23 hospitalized for vaso-occlusion and / or infection. We investigated the polymorphisms -251T>A and -308G>A respectively located in the genes of IL-8 and TNF-alpha by PCR and PCR-RFLP; serum levels of IL-8 were detected by ELISA and the clinical history of patients was obtained from medical records. There was an association between the presence of the mutant allele A for the polymorphism -308G>A and occurrence of splenic sequestration ( $p < 0.05$ ). Interestingly, serum levels of IL-8 were  $32.3 + 43.3$  pg / ml. The A allele of -251 polymorphism of IL-8 gene was associated with elevated levels of IL-8, independent of the inducing factor. Together, our results showed the importance of the interaction of prognostic markers in the monitoring of patients with sickle cell anemia and the involvement of IL-8 at the process of vaso-occlusion. Additional studies are warranted to establish the role of interleukin-8 and TNF-alpha, and the presence of polymorphisms in these genes, in order to confirm their use as prognostic markers in the clinical follow up of these individuals.*

**Keywords:** Cytokines, prognostic, sickle cell anemia.

A doença falciforme compreende grupo de distúrbios hereditários caracterizado pela presença da hemoglobina S (HbS), que é decorrente da mutação pontual no sexto códon do gene da globina  $\beta$ , levando a substituição do ácido

glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica beta ( $\beta^S$  6<sup>Glu→Val</sup>)<sup>(27)</sup>. Os homocigotos para a HbS são portadores da anemia falciforme (AF) e apresentam anemia hemolítica grave. Outras hemoglobinas variantes podem estar associadas à HbS, como as hemoglobinas C, D e E, dentre outras, podendo haver também interações com as talassemias. A associação dessas hemoglobinas determina a gravidade da doença falciforme e os portadores apresentam quadro clínico heterogêneo variando entre formas intermediárias a graves<sup>(12,31)</sup>.

Os indivíduos com AF apresentam quadro clínico heterogêneo, com gravidade elevada, podendo apresentar

Recebido em 13/6/2010

Aceito em 30/9/2010

Endereço para correspondência: Profa. Marilda Souza Gonçalves, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador-Bahia, Brasil. C-elo: mari@bahia.fiocruz.br. Fontes de Financiamento: CNPq 3065427/2007-5 e 484457/2007-1; FAPESB 1431040053063 e 9073/2007 e MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 409800/2006-6.

retardo no crescimento e desenvolvimento, bem como alterações em vários órgãos, sempre em decorrência da hemólise contínua, de fenômenos vaso-oclusivos e hospitalizações frequentes<sup>(1 2 6)</sup>. Outras complicações são o acidente vascular cerebral (AVC); a síndrome torácica aguda; úlceras de perna; sequestro esplênico; alterações pulmonares e oculares e o priapismo, entre outras<sup>(5 18 28 32)</sup>. As infecções são comuns na AF, sendo consideradas causa importante de morbidade e mortalidade em crianças. Alguns estudos referem às crises vaso-oclusivas e infecções como as principais causas de hospitalização entre esses indivíduos<sup>(21 26)</sup>.

A fisiopatologia da anemia falciforme é multifatorial, e a heterogeneidade clínica da doença é decorrente da interação de diversos fatores, tais como, a quantidade elevada de hemoglobina polimerizada no interior das hemácias, contribuindo para ativação de reticulócitos, hemácias falcizadas, leucócitos e endotélio vascular, com o aumento da expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e VCAM-1. Além disso, são descritas alterações na concentração de hemoglobina total e de hemoglobina fetal (HbF); o aumento no número de leucócitos, ativação de monócitos, expressão de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas<sup>(4 18 26 28)</sup>.

Cumprе ressaltar que alterações no sistema imune que estão associadas a deficiências na via alternativa do complemento, bem como alterações na função de leucócitos podem contribuir para a ocorrência de infecções frequentemente descritas nesses pacientes<sup>(4 8 18)</sup>.

Os aspectos imunológicos dessa doença têm sido cada vez mais estudados. Os níveis elevados de citocinas Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) e de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e TNF-alfa) no plasma de indivíduos com anemia falciforme em estado estável têm sido descritos, possivelmente relacionados ao aumento da expressão ou ativação das moléculas de adesão em neutrófilos e no endotélio vascular, apesar do papel fundamental dessas citocinas na fisiopatologia da anemia falciforme ainda não estar completamente claro<sup>(29)</sup>.

Os níveis séricos elevados de IL-8 tem sido observados em indivíduos em crise vaso-oclusiva, aspecto clínico importante da patogênese da anemia falciforme<sup>(9)</sup>. O polimorfismo -251T>A presente na região promotora do gene IL-8 tem sido associado a níveis elevados desta citocina, sendo que a presença do genótipo AA foi relacionada à gravidade da doença<sup>(13)</sup>.

O polimorfismo -308G>A na região promotora do gene do TNF-alfa tem sido associado a diferentes condições inflamatórias e a presença do alelo mutante A parece influenciar na expressão do TNF-alfa, sendo o genótipo AA considerado alto produtor<sup>(10 17)</sup>.

Neste trabalho investigamos os níveis séricos de IL-8 em indivíduos com anemia falciforme na fase estável da doença e quando hospitalizados, visando o encontro de uma possível associação com o histórico clínico. Também foi investigada

uma possível correlação dos polimorfismos -251T>A no gene da IL-8 e -308G>A no gene do TNF-alfa com a gravidade clínica da anemia falciforme.

## Material e Métodos

### Casuística

Foram investigados 126 indivíduos com anemia falciforme distribuídos em dois grupos distintos: grupo de pacientes em estado clínico estável da doença (PE) composto por 103 indivíduos acompanhados regularmente no ambulatório de Hematologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), da Secretaria de Estado da Saúde da Bahia (SESAB), entre Agosto de 2005 a Setembro de 2006; e o grupo de pacientes em crise (PC) formado por 23 pacientes em idade pediátrica internados no Hospital da Criança (HC) das Obras Sociais Irmã Dulce, no mesmo período (de 08/2005 a 09/2006).

No grupo PE, a coleta de sangue venoso em EDTA foi realizada durante a consulta ambulatorial e os dados clínicos foram obtidos através de busca retrospectiva nos prontuários médicos. No grupo PC, foram incluídos pacientes menores, internados por vaso-oclusão e/ou infecção e realizadas duas coletas de sangue, sendo a primeira coleta nos primeiros dias de internação e a segunda no dia da alta hospitalar, quando o grupo foi denominado paciente em alta (PA). Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes, sendo considerada como idade pediátrica aquela inferior a 18 anos.

A frequência dos polimorfismos de citocinas foi investigada entre os portadores de anemia falciforme em um grupo de referência da população de Salvador, sendo composto por 212 indivíduos saudáveis.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz (CAAE-0010.1.225.000-05) e está em acordo com a Declaração de Helsinki de 1975 e sua revisão de 2000.

As amostras de sangue e os dados clínicos e demográficos foram coletados após a assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes ou responsáveis legais.

### Análises hematológicas e de hemoglobinas

A determinação dos valores hematológicos e índices hematimétricos foi realizada em contador eletrônico de células (*Coulter Count T – 890, Beckman Coulter*) e a análise morfológica das hemácias pela observação microscópica de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Wright. O perfil de hemoglobinas foi confirmado pela técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em equipamento automatizado (*Variant II- Bio-rad*).

### Ensaio de genotipagem

O DNA genômico foi isolado a partir de 200µL de sangue periférico, utilizando-se o método direto *QIAamp® DNA Mini Kit (Quiagen)* e armazenado a -20°C. Os polimorfismos nos

genes das citocinas -251T>A no gene da *IL-8* e -308G>A no gene do TNF-alfa foram investigados pela reação de PCR e posterior digestão com enzimas de restrição (RFLP)<sup>(11,25)</sup>. Os produtos obtidos nas reações foram analisados em gel de agarose (1%) e os produtos da RFLP em gel de poliacrilamida (7%).

#### Detecção dos níveis séricos de citocinas

As dosagens de *IL-8* e de TNF-alfa foram realizadas pela técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (*BD OptEIA - Biosciences*) de acordo com as instruções do fabricante, sendo considerado como valor de referência normal  $\leq 15$  pg/mL para *IL-8* e  $\leq 7,8$  pg/mL para o TNF-alfa.

#### Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos programas EPI-INFO versão 6.04 e GraphPad Prism versão 5. As análises de regressão linear foram realizadas com o programa estatístico SPSS versão 9.0. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### Resultados

Os pacientes que compuseram o grupo PE apresentaram idade média de 14,5 ( $\pm 12,4$ ) anos. Entre eles, 81(80,2%) apresentaram histórico de algum tipo de comorbidade, sendo mais frequentes as crises vaso-oclusivas em 90/103 (87,4%), as infecções em 48/103 (46,6%), dentre elas as infecções, as do trato respiratório (ITR) foram descritas em 25/48 pacientes (52%), as pneumonias em 18/48 (37,5%), broncopneumonias em 9/48 (18,7%), infecção do trato urinário (ITU) em 6/48 (12,5%) e osteomielite em 4/48 (8,3%).

No grupo PC, 78,3% apresentaram história de algum tipo de infecção, sendo as mais comuns as pneumonias (60,8%), a infecção do trato urinário (39,1%) e infecção do trato respiratório (13%). A Tabela 1 mostra o histórico das comorbidades mais frequentes nos pacientes dos grupos estudados de acordo com a idade.

**Tabela 1.** Distribuição por faixa etária (em anos) do histórico de manifestações clínicas entre os pacientes com anemia falciforme dos dois grupos estudados (grupo de pacientes em estado clínico estável; e grupo de pacientes em crise).

COMORBIDADES	FAIXA ETÁRIA, anos - n(%)				p
	2  —  5 (n=30)	6  —  12 (n=45)	13  —  20 (n=32)	>21 (n=19)	
Vaso-oclusão	28 (93,3)	42 (93,3)	28 (87,5)	13 (68,4)	0,011 <sup>a</sup>
Acidente vascular cerebral	2 (6,7)	0	2 (6,3)	2 (10,5)	0,62 <sup>a</sup>
Sequestro esplênico	5 (16,7)	2 (4,4)	0	0	0,008 <sup>a</sup>
Infecção do trato urinário	5 (16,7)	8 (17,8)	0	2 (10,5)	0,21 <sup>b</sup>
Infecção do trato respiratório superior	6 (20)	10 (22,3)	7(21,9)	5 (26,3)	0,24 <sup>a</sup>
Pneumonia	9 (30)	13 (28,9)	4 (12,5)	2 (10,5)	0,36 <sup>a</sup>
TOTAL	126	75	41	24	-

<sup>a</sup> Teste exato de Fisher; <sup>b</sup>  $\chi^2$  corrigido pelo Yates.

No grupo PE, a maioria (93,2%) estava em uso profilático regular de ácido fólico, 40,7% usavam analgésicos e 28,1% antibióticos. Não foi encontrada correlação entre o uso de penicilina profilática e a ausência de infecção (OR=1,33; IC=0,57–3,15). Entre os indivíduos do grupo PC observamos que 78,3% usavam regularmente ácido fólico, 39,1% utilizavam antibioticoterapia, também regular, com penicilina; e 21,7% utilizavam analgésicos.

Com relação ao estudo dos polimorfismos de citocinas observamos que o polimorfismo -251T>A no gene da *IL-8* e -308G>A no gene do TNF-alfa estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A Tabela 2 mostra a distribuição dos genótipos no grupo de pacientes com anemia falciforme relacionando com as principais comorbidades.

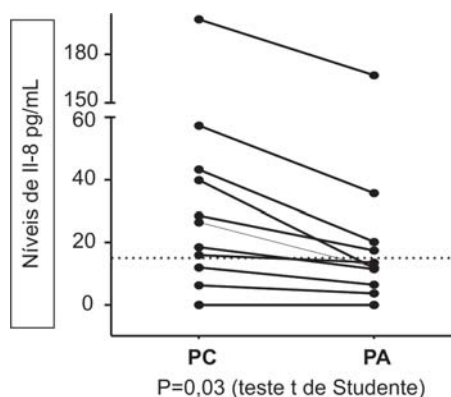
**Tabela 2.** Polimorfismos nos genes de citocinas e aspectos fenotípicos no grupo de pacientes com anemia falciforme.

Polimorfismos (n)	Diagnósticos - n (%)				
	Infecção	Pneumonia	ITRS*	SE**	AVC***
<b>-251 da <i>IL-8</i></b>					
AA +AT (85)	48 (55,8)	18 (20,9)	17 (19,7)	5 (5,8)	4 (4,7)
TT (41)	20 (47,6)	7 (16,7)	12 (28,6)	2 (4,8)	3 (7,1)
Valor de p	0,49 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	0,68 <sup>b</sup>
<b>-308 <i>TNF-alfa</i></b>					
GG (101)	55 (55)	21 (21)	22 (22)	3 (3)	5 (5)
GA + AA (25)	13 (46,4)	4 (14,2)	7 (25)	4 (14,2)	2 (7,1)
Valor de p	0,55 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,64 <sup>b</sup>

ITRS, Infecção do trato respiratório superior; \*\*SE, Sequestro esplênico; \*\*\*AVC, Acidente Vascular Cerebral; <sup>a</sup> $\chi^2$  corrigido pelo Yates; <sup>b</sup>Teste exato de Fisher.

Os níveis séricos de *IL-8* foram estimados em 53 pacientes do grupo PE, 22 do grupo PC e 13 do grupo PA. Os pacientes pertencentes ao grupo PA foram os mesmos indivíduos do grupo PC que tiveram uma nova avaliação no momento da alta médica. A média dos níveis séricos de *IL-8* foram 6,7 pg/mL (1,7 – 38,8) e de TNF-alfa 31,5 (1,3 – 68,8). A análise pareada dos níveis séricos de *IL-8* no grupo PC e PA demonstrou a diminuição gradual dos níveis de *IL-8*, sendo que os indivíduos em alta médica ainda apresentavam níveis elevados de *IL-8* ( $p < 0,05$ , Teste t de Student pareado) (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Níveis séricos de *IL-8* em pacientes internados (PC) e quando da alta hospitalar (PA).



A Tabela 3 mostra os resultados da associação dos diferentes genótipos dos polimorfismos nos genes da IL-8 e TNF-alfa nos pacientes pediátricos dos grupos PE e PC.

**Tabela 3.** Associação entre os genótipos do polimorfismo -251T>A (IL-8) e -308G>A (TNF-alfa) e níveis séricos de IL-8 no grupo de pacientes pediátricos em estado clínico estável da doença (PE) e em crise (PC).

Genótipo da citocina	Grupo do paciente n (%)		Valor de p	Níveis séricos de IL-8 (pg/mL)		Valor de p
	PE	PC		Média ± DP		
				PE	PC	
<b>IL-8</b>						
AA	10 (14,9)	7 (30,4)	0,24 <sup>a</sup>	1,2 ± 3,0	22,1 ± 26,5	0,06 <sup>c</sup>
AT	37 (55,2)	8 (34,8)	0,14 <sup>a</sup>	7,0 ± 12,	59,9 ± 89,5	0,06 <sup>c</sup>
TT	20 (29,8)	8 (34,8)	0,85 <sup>a</sup>	1,6 ± 4,4	17,9 ± 16,9	0,003 <sup>c</sup>
AA+AT	47 (70,1)	15 (65,2)	0,85 <sup>a</sup>	5,7 ± 10,9	41,0 ± 66,4	0,0091 <sup>c</sup>
AT+TT	57 (85,0)	16(69,5)	0,93 <sup>a</sup>	5,1 ± 10,3	37,5 ± 63,7	0,001 <sup>c</sup>
<b>TNF-alfa</b>						
GG	55 (82)	20 (86,9)	0,75 <sup>b</sup>	3,5 ± 8,4	35,6 ± 57,9	0,002 <sup>c</sup>
GA	12 (18)	3 (13,1)	0,75 <sup>b</sup>	8,3 ± 13,2	13,8 ± 12,6	0,55 <sup>d</sup>
GG+GA	67 (100)	23 (100)	- <sup>e</sup>	4,5 ± 9,6	32,6 ± 54,3	0,0001 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>χ<sup>2</sup> corrigido pelo Yates; <sup>b</sup>Teste exato de Fisher; <sup>c</sup>Kruskal-Wallis; <sup>d</sup>ANOVA; <sup>e</sup>Não foi realizada análise estatística, uma vez que não foi encontrado o genótipo AA para o polimorfismo no gene do TNF-alfa.

## Discussão

As manifestações clínicas mais comumente encontradas nos pacientes com anemia falciforme do grupo PE foram as crises vaso-oclusivas, infecções e sequestro esplênico, confirmando a heterogeneidade fenotípica da anemia falciforme<sup>(12-24)</sup>. Quando os pacientes foram analisados de acordo com a idade, observamos que eventos clínicos como vaso-oclusão, infecções do trato respiratório e do trato urinário, sequestro esplênico e pneumonia ocorreram mais frequentemente na idade pediátrica, especialmente na faixa etária até os 12 anos. O risco de infecção em uma criança menor que 5 anos é 30 vezes maior que em crianças da população geral, concordando com nossos resultados que descreveram a prevalência elevada de infecções bacterianas na infância<sup>(8-13)</sup>.

Neste estudo, nós observamos que o histórico dos indivíduos em acompanhamento ambulatorial apresentou número menor de episódios infecciosos que o histórico dos pacientes internados (PC) (p=0,014), possivelmente devido ao fato desses indivíduos estarem sob cuidado médico contínuo e em uso de medicamentos profiláticos, aspectos importantes na estabilidade clínica da doença. Além disso, o acompanhamento clínico dos pacientes com anemia falciforme tem aumentado a expectativa de vida desses indivíduos, principalmente com a realização do diagnóstico precoce, aconselhamento familiar, uso profilático de antibióticos, vacinação e mais recentemente com uso de hidroxiuréia (HU) e terapia poli-transfusional<sup>(16)</sup>.

Estudos realizados na população brasileira comparando as causas de hospitalização em pacientes pediátricos da cidade

de Salvador e de São Paulo descreveram a vaso-oclusão como causa principal de internação hospitalar nas duas populações<sup>(18)</sup>. As causas mais comuns de internação em crianças hospitalizadas no Congo foram as vaso-oclusões (26,7%) e infecções (36,6%) em crianças menores de 5 anos; nas crianças maiores de 5 anos a causa principal de hospitalização foi a ocorrência de colelitíase ou cardiopatia<sup>(23)</sup>. Apesar de muitos estudos relatarem a relação entre a infecção e a crise de vaso-oclusão, ainda não foi possível afirmar se a infecção pode desencadear o fenômeno vaso-oclusivo ou eventos subclínicos, bem como a sequência em que esses eventos ocorrem<sup>(19)</sup>. Desta forma, a condição inflamatória crônica da anemia falciforme e a imunidade individual podem estar diretamente relacionadas à ocorrência de infecções, apesar de não ser ainda conhecido que componente do sistema imune está diretamente envolvido na susceptibilidade elevada as infecções recorrentes apresentadas por esses pacientes. O início dos eventos de vaso-oclusão envolve fatores determinantes da obstrução dos vasos como a perfusão tecidual, diminuição do calibre dos vasos e a tendência de adesão das hemácias ao endotélio vascular<sup>(3)</sup>.

A importância dos leucócitos na clínica da anemia falciforme tem sido bastante evidenciada em estudos que associam a leucocitose como fator de risco para a ocorrência de AVC e síndrome torácica aguda. A participação dos leucócitos na vaso-oclusão começa a partir do processo de rolamento e da expressão de integrinas que promovem o aumento da adesão ao endotélio vascular. Após a adesão ao endotélio vascular as hemácias diminuem o fluxo sanguíneo e facilitam a ligação de mais hemácias falciformes, iniciando a obstrução vascular<sup>(22)</sup>. Além disso, os leucócitos são estimulados a liberar proteínas citotóxicas e substâncias vaso-ativas, citocinas e quimiocinas que irão promover a atração de mais leucócitos para esses sítios. O neuropeptídeo substância P, mediador da inflamação e da dor é responsável também pela secreção de citocinas como IL-1, IL-6, TNF-alfa e IL-8 e tem sido descrito em níveis elevados em pacientes com anemia falciforme durante a crise vaso-oclusiva<sup>(20)</sup>.

O aumento de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), IL-8 e TNF-alfa têm sido descritas no plasma de indivíduos com anemia falciforme em estado estável, sendo que possivelmente essas alterações estão associadas ao aumento da expressão ou promovem a ativação das moléculas de adesão em neutrófilos e no endotélio vascular<sup>(20)</sup>. Nossos resultados demonstram que os indivíduos internados por crise apresentam níveis de IL-8 mais elevados que os indivíduos em estado estável, sendo que a maioria dos indivíduos em estado estável apresenta nível de IL-8 menor que 1pg/mL, concordando com estudos anteriores, sendo que alguns autores descrevem a IL-8 como marcador de crise em pacientes com anemia falciforme<sup>(7,9)</sup>. Ressaltamos que os níveis de IL-8 permaneceram elevados durante a crise e que mesmo após a alta médica esses níveis não retornaram a seu estado basal, sugerindo que o restabelecimento dos níveis de IL-8 é bastante lento. Neste ponto podemos levantar algumas



hipóteses: Os níveis de IL-8 permanecem elevados após a fase aguda (crise ou infecção) devido ao caráter crônico da anemia falciforme ou existe algum mecanismo na fisiopatologia da doença que contribui para a manutenção dessas taxas? Durante quanto tempo os níveis de IL-8 permanecem elevados, uma vez que esses indivíduos ficaram internados em média 15,6 ( $\pm$  20,3) dias; esse período prolongado de níveis elevados de IL-8 pode influenciar no restabelecimento do paciente ou até mesmo desencadear nova crise? Os indivíduos com níveis mais elevados de IL-8 estão mais susceptíveis a ocorrência de crise?

Desta forma, estudos adicionais são necessários para o monitoramento dos níveis de IL-8 após a alta médica dos pacientes, visando estimar o tempo que decorre entre a crise e o restabelecimento dos níveis dessa citocina, bem como a sua influência nos processos fisiopatológicos e imunológicos presentes na doença.

As análises de frequência dos polimorfismos -251T>A e -308G>A demonstraram que esses polimorfismos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em nossa população. O alelo mutante A para o polimorfismo -251T>A no gene da IL-8 tem sido relacionado com a produção elevada desta citocina, sendo classificados o genótipo AA como produtor elevado de IL-8, o AT como produtor intermediário e o TT como produtor baixo<sup>(13)</sup>. Nossos achados mostram que o genótipo AT apresentou níveis séricos de IL-8 mais elevados, porém não foi possível associar à presença do alelo A (produtor alto de IL-8) com os aspectos clínicos frequentes na doença, apesar de observarmos um número elevado de eventos em indivíduos que apresentam o alelo A. Possivelmente devido à heterogeneidade clínica e a possível ocorrência de eventos subclínicos, que muitas vezes não são informados pelo paciente.

Quando comparamos os níveis séricos de IL-8 nos diferentes grupos estudados observamos que os portadores do alelo A possuem níveis mais elevados em relação aos do alelo T, sendo esta associação mais relevante em indivíduos em alta médica ( $p < 0,05$ ). Esses resultados são ainda reforçados pela análise de regressão linear, que confirma a relação entre a presença do alelo selvagem (produtor alto) e os níveis elevados de IL-8 no grupo de pacientes no momento da crise e alta hospitalar.

Alguns estudos têm relacionado o polimorfismo -251T>A no gene da IL-8 à ocorrência de infecção pelo vírus sincicial respiratório<sup>(13,14)</sup>, a susceptibilidade a esclerose múltipla e ao risco de doença gastrointestinal<sup>(15)</sup>, entre outras patologias. Porém, não encontramos relação entre a presença do polimorfismo -251T>A e a ocorrência de infecções, possivelmente pelos mecanismos complexos que envolvem a fisiopatologia da anemia falciforme, ressaltando o seu caráter pró-inflamatório crônico e a associação a outros fatores que indiretamente podem estar influenciando na expressão genotípica e fenotípica da doença.

O polimorfismo -308G>A na região promotora do gene do TNF-alfa tem sido associado a níveis elevados dessa

citocina. O alelo A para esse polimorfismo tem sido associado à ocorrência de choque séptico grave e óbito ou até mesmo a ocorrência de complicações neurológicas<sup>(10)</sup>. Neste estudo foi possível observar a associação entre a presença do polimorfismo -308G>A e a ocorrência de sequestro esplênico ( $p < 0,05$ ). Outro estudo demonstrou AA ocorrência de níveis elevados de TNF-alfa em indivíduos com anemia falciforme<sup>(29)</sup>. Nosso estudo não teve como objetivo realizar a dosagem dos níveis séricos de TNF-alfa, mas acreditamos que estudos adicionais serão necessários visando estabelecer a relação entre os níveis séricos de TNF-alfa e as manifestações clínicas descritas na doença, bem como estabelecer a associação dos polimorfismos estudados e os níveis dessas citocinas, visando elucidar o papel do TNF-alfa e IL-8 como fator de risco para a ocorrência de crise na anemia falciforme, destacando a sua participação nos processos de oclusão da microcirculação e após os eventos de crise<sup>(30)</sup>.

A dinâmica dessas citocinas na anemia falciforme e o papel real da IL-8 e do TNF-alfa como marcadores da ocorrência de crise vaso-oclusiva ainda precisam ser esclarecidos.

Estudos adicionais são necessários visando esclarecer as questões aqui levantadas, bem como os mecanismos envolvidos nos processos infecciosos e de vaso-oclusão presentes na anemia falciforme, de maneira que possamos estabelecer o valor prognóstico tanto dos polimorfismos gênicos, como dos níveis séricos dessas citocinas no desenvolvimento das manifestações clínicas presentes nessa doença.

## Referências

1. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rêgo M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 21: 292-298, 2005.
2. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. [Manual da Anvisa], Brasília (DF), p.10-11, 2002.
3. Chies JAB, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 57: 46-50, 2001.
4. Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *Am J Hematol* 76: 343-47, 2004.
5. Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia, Fundamentos e Prática*. 1ª edição, São Paulo: Atheneu, p. 289-308, 2001.
6. Embury SH. Sickle cell disease. In: Hoffman R, Benz Junior EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. *Hematology*. 2ª edição. New York: Churhill Livingstone, p. 611-640, 1995.
7. Etienne-Julan M, Belloy MS, Decastel M, Dougaparsad S, Ravion S, Hardy-Dessources M. Childhood sickle cell crises: clinical severity, inflammatory markers and the role of interleukin-8. *Haematologica* 89: 863-864, 2004.
8. Gary DO. Prevention of invasive pneumococcal infection in sickle cell disease on the threshold of a new era of successes? *J Pediatr* 143: 438, 2003.
9. Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, Albuquerque A, Sant'Ana A, dos Reis MG, Barral A, Barral Netto M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res* 10: 1309-1313, 2001.

10. Hajjer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF-alpha production and disease. *Hum Immunology* 62: 1191-1199, 2001.
11. Heinzmann A, Ahlert I, Kurz T, Berner R, Deichmann KA. Association study suggests opposite effects of polymorphisms within IL-8 on bronchial asthma and respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J All Clin Immunol* 114: 671-676, 2004.
12. Hiran S. Multiorgan dysfunction syndrome in sickle cell disease. *J Assoc Physicians India* 53: 19-22, 2005.
13. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A, Kwiatkowski D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet* 69: 413-419, 2001.
14. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 55: 1023-1027, 2000.
15. Kamali-Servestani E, Nikserest AR, Aliparasti MR, Vessal M. IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Letters* 404: 159-162, 2006.
16. Loggeto SR, Pellegrini-Braga JA, Costa-Carvalho BT, Sole D. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 22: 77-82, 1999.
17. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 113: 401-406, 1998.
18. Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JAP, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad STO, Figueiredo MF, Costa FF. Clinical, hematological and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saúde Pública* 21: 1287-1290, 2005.
19. Mabilia-Babela JR, Nkanza-Kaluwako SA, Ganga-Zandzou PS, Nzingoula S, Senga P. Effects of age on causes of hospitalization in children suffering from sickle cell disease. *Bull Soc Pathol Exot* 98: 392-393, 2005.
20. Michaels LA, Ohene-Frempong K, Zhao H, Douglas SD. Serum levels of substance P are elevated in patients with sickle cell disease and increase further during vaso-occlusive crisis. *Blood* 92: 3148-51, 1998.
21. Ohene-Frempong K, Steinberg MH. Clinical aspects of sickle cell anemia in adults and children. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel (eds.). *Disorders of hemoglobin - genetics, pathophysiology and clinical management*. New York: Cambridge University press, p. 611-670, 2001.
22. Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. *Blood* 18: 65-73, 2004.
23. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 103: 4023-4027, 2004.
24. Redding-Lallinger R, Knoll C. Sickle cell disease- pathophysiology and treatment. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc Health Care* 36: 346-376, 2006.
25. Seitzer U, Swider C, Stuber F, Suchnicki K, Lange A, Richter E, Zabel P, Muller-Quernheim J, Flad HD, Gerdes J. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. *Cytokine* 9: 787-790, 1997.
26. Smith WR, Bovbjerg VE, Penberthy LT, McClish DK, Levenson JL, Roberts JD, Gil K, Roseff SD, Aisiku IP. Understanding pain and improving management of sickle cell disease: the PiSCES study. *J Natl Med Assoc* 97: 183-93, 2005.
27. Steinberg MH. Genetic modulation of sickle cell anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 209: 1-13, 1995.
28. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 364: 1343-360, 2004.
29. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology* 9: 61-64, 2004.
30. Wagner MC, Eckman JR, Wick TM. Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med* 144: 260-267, 2004.
31. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 79: 704-712, 2001.
32. Weatherall DJ, Provan AB. Red cells In: *Inherited anaemias*. *Lancet* 355: 1169-1175, 2000.