

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO IMUNOGENÉTICA DE PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME**

**ELVIRA ALICIA APARICIO CORDERO**

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla**

**Tese de Doutorado**

**Porto Alegre, 2009**

**C794a Cordero, Elvira Alicia Aparício**

Avaliação imunogenética de pacientes com anemia falciforme / Elvira Alicia Aparício Cordero ; orient. Lucia Mariano da Rocha Silla. – 2009.

117 f.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Anemia falciforme 2. Infecção 3. Imunogenética 4.

Polimorfismo genético 5. Antígenos HLA 6. MicroRNAs I. Silla,

Lucia Mariano da Rocha II. Título.

NLM: WH 170

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **Epígrafe**

**“As adversidades desperta em nós  
capacidades que, em circunstâncias  
favoráveis, teria ficado adormecidas”**

**Horácio**

## Agradecimentos

- Ao povo brasileiro por ter-me acolhido com tanto carinho.
- A UFRGS, ao HCPA, aos Programas de Pós-Graduação, em Medicina: Ciências Médicas e em Genética e Biologia Molecular.
- As entidades financiadoras pelo investimento que fazem na pesquisa.
- Ao pessoal médico e administrativo do HCPA.
- Aos pacientes do ambulatório de Hemoglobinopatias do HCPA, sem suas amostras não teria sido feito este trabalho.
- Aos que me abriram as portas neste caminho, foram e são meus orientadores. Deles aprendi muitas coisas, a não desesperar-se, a saber lidar com as coisas adversas e sobre tudo a ter paciência, muita paciência que as coisas vão acontecer. De coração muito obrigada Lucia, Nance e ao Zeca. Ainda tenho muito que aprender de vocês.
- A meus queridos colegas dos Laboratórios de LACAM HCPA e Imunogenética da UFRGS, pelo grande estímulo que tive para a realização deste projeto.
- A todo o grupo do Imunopovo porque com cada um deles compartilhei bancada, dias alegres, dias tristes, dias eufóricos, dias com saudade e assim todos os dias que a gente estava junto, não quero dizer somente dias de trabalho, também nos finais de semana fazendo yoga. Não quero descrever a cada um porque seria muita coisa....., mas cada um deles sabe como eu gosto deles, como os respeito sei que pude contar com eles os dias que mais precisava. Aos antigos amigos, de quando estava no Mestrado e com algum deles ainda compartilhei trabalho e ainda lembro o sobrenome: Ale Peres, Melissa Camassola, Larisa Heinzelmann, Andrés Delgado, Pedro Chagastelles, Déia Wieck, Paula Rohr, Dani Garcia Gustavo Viera. Aos novos integrantes do imunopovo, que quando cheguei subiram-me dar sua amizade e agora fazem parte do grupo a Patty

Sesterheim, Priscila Vianna, Marcia Trein, Dani Oberdoerfer, Fernanda Rabaioli, Priscila Machado, Gabi Kniphoff, Nadine Glesse, Bruno dos Santos, Cris, Guilherme, Linder, Matheus, Mauricio, Juciana, Juliana. E a querida dona Dilma.

- E não posso esquecer de agradecer a meus amigos e autores também dos artigos Tiago Veit e Tiago Dalberto porque sem ajuda deles não começava, nem terminava no andamento do projeto, desculpem não ter-lhes colocado no imunopovo (sei que vocês pertencem ao grupo), só quero que saibam que foi um prazer enorme ter trabalhado com vocês diretamente e ter suportado tantos sotaques.
- Não posso dizer que tive somente uma casa, eu tive duas. A todo grupo do HCPA, aos médicos Cristina Bittar, João Friederisch, Ale Paz, Claudia Astigarraga, Liane Daudt, Rossane Bittencourt, as pessoas queridas como a secretaria Neusa Laydner, a Cida Maria, a todo o pessoal que trabalhou ou ainda trabalha na hemato: Liane P, Karla L, Luana, Ingrid M. Seria ingrata se não mencionasse aos estagiários que diretamente e indiretamente me ajudaram Lisiane Knebel, Joice Merzoni, Marina M, Juliana F, Vanessa V, Anne R, Anne P, Patty, Pablo V, Lauro.
- Aos secretários da Pós-graduação Vera, Fagner, Lucas; Elmo e Ellen.
- Aos amigos da Terapia Gênica do HCPA, Ursula Matte, Carol, Fernanda, Valesca, Guilherme, Antonio e Lili.
- Aos sempre amigos de dias ruins e dias bons José Rodrigues e Fernanda Camargo; junto a eles seu “niño” Antonio Gabriel. Dom Gumercindo e dona Flora.
- A amiga Janer Bittencourt, suas filhas Patricia e Priscila, por não esquecerme quando se trata de celebrar alguma coisa.
- A Karla e Luiz e a toda sua querida família Valkimil.
- A Marlene, Manuel, Marcia e Marcelo por socorrerme nos momentos difíceis.
- A família da Pompeia: Pe João, Joaquin, Jairo e Lauro. Hna Victoria e Leticia, aos secretários Eduardo e Karla. Ao Dr. Humberto Scorza; a amiga

de mil amigos Valesca Gerson, Caroline Cheese e toda os amigos migrantes que participam.

- Ao sempre amigos Lindolfo Meirelles e Adriana, Kátia Delgado e Beto, Cintia Cichowski e Daniel, Christina Bittar e Antônio, Aline Mello e Igor, Katia Heckler e Cleverson, Lia Thimming e Luciano, Dani León e Ângelo, Lúcia e Diter.
- A Cristina Lizzott, Sandrine Wagner, Andréia Sopelsa, Andréia Kirst, Camila Machado, Nice, Ricardo Cruz, Tiago Gil, Claudiram Roll, Janaina Pereira, Larise Germâni, Cássio Stein.
- Ao Profa. Maria Medianeira, Prof. Ellis Busnello e Frederico Kliemann.
- A minhas entranhaveis amigas Rosa Flores, Rossy Maravi e Patricia Vivanco.
- Aos mil amigos que fiz: muito obrigada por sua amizade e por nunca permitirem sentirme solzinha
- A Luís Ricardo por tudo!!

Todo grande sonho não nasce sozinho. Cada pedaço da realização tem o suor, a dedicação e a harmonia de quem sonharam juntas. Aqui estou eu, feliz por poder realizar esse grande sonho e compartilhá-lo com as pessoas que me ajudaram. O mínimo que posso dizer é: **Muito Obrigada!**

Elvira

## **DEDICATÓRIA**

**A mía querida familia, que siempre me comprendieron y aceptaron mis  
decisiones, solo espero no haberles decepcionado**

**A mis padres Augusto Sergio e Irma Enma**

**A mi hermano Sergio Orestes e su esposa Ivette**

**A mi esposo Luís Ricardo**

**A mi querida familia, tan numerosa: mi abuela, mis tíos y tías, primos y  
primas y mil sobrinos e sobrinas.**

**Mi abuela Alicia.**

**Mis tíos abuelos: Alejandrina, Victorio, Arnulfa.**

**Mis tíos Marina e Felipe**

**“Não preciso mudar o mundo,**

**mas se conseguir melhorá-lho está ótimo”**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE ANEXOS .....	14
DADOS COMPLEMENTARES .....	15
RESUMO .....	16
INTRODUÇÃO .....	18
Hemoglobina .....	18
REVISÃO DA LITERATURA .....	23
Epidemiologia da HbS .....	23
Padrão de Herança da AF .....	24
Diagnóstico da AF .....	25
Fisiopatologia .....	26
Quadro clínico da AF.....	31
Anemia .....	31
Síndrome mão pé.....	32
Crise hemolítica .....	32
Crises dolorosas em ossos e articulações .....	32
Seqüestro esplênico .....	33
Síndrome torácica aguda .....	33
Doença pulmonar crônica .....	34
Doença biliar .....	34
Seqüestro hepático .....	34
Doença hepática crônica .....	35
Doença vascular .....	35
Doença do sistema nervoso central .....	35
Doença renal .....	36
Doença ocular .....	36
Úlcera de perna .....	37
Deficiência no crescimento e desenvolvimento .....	37
Priapismo .....	37
HCV .....	38



Infecções .....	40
Tratamento da anemia falciforme .....	40
O sistema imunológico da AF .....	41
Imunidade adaptativa na AF .....	43
Sistema de histocompatibilidade leucocitária humana .....	48
Micro-RNA .....	50
Citocinas .....	50
Interleucina 10 .....	52
JUSTIFICATIVA .....	55
OBJETIVOS .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA. . .	57
ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS: .....	79
Abstract .....	80
Introduction .....	81
Material and methods .....	82
Results .....	83
Discussion .....	86
Referências .....	89
<b>INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.</b> .....	98
<b>Anexo I: DADOS COMPLEMENTARES.</b> .....	104
<b>Anexo II : PROTOCOLO DE ANEMIA FALCIFORME</b> .....	110
<b>Anexo III: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.</b> . .	114
<b>Perspectivas.</b> .....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,3- DPG = 2,3 difosfoglicerato

A = Adenina

ACTH = hormônio adenocorticotrófico

AF = Anemia falciforme

AS = Genótipo heterozigoto para o alelo *HBB*\*S

APC = Célula Apresentadora de Antígeno; (*Antigen Presenting Cells*)

AVC = Acidente vascular cerebral

Ben = Haplótipo Benin

BCAM = Molécula de adesão celular basal ;(*basal cell adhesion molecule*)

C = Citocina

Car = Haplótipo Bantu ou República da Africa central

Cam = Haplótipo Camarões

CD8+ = Linfocitos T Citóxicos

CD4+ = Linfocitos T auxiliares ou Linfocitos T helper

cGMP = Monofosfato de guanina ciclica

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

DNA = Ácido desoxirribonucléico; (*deoxyribonucleic acid*)

G = Guanina

GF = Fatores de crescimento

Glu = Acido glutâmico

GM-CSF = Fator estimulante de colônia granulócito- macrófago; (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GP 1b-IX-V = Complexo da glicoproteína de plaquetas 1b-IX-X

GP IIb-IIIa = Receptor plaquetário glicoproteína IIb-IIIa

GTP = Trifosfato de guanosina

HAP = Hipertensão arterial pulmonar

Hb = Hemoglobina

HbA = Hemoglobina normal A

HbF = Hemoglobina fetal

HBS = Hemoglobina S

HCV = Hepatitis C

HLA = Antígeno leucocitário humano; (*Human Leukocyte Antigen*)

HLA-G = Antígeno leucocitário humano G

HPLC = Cromatografia líquida de alta performance; (*high performance liquid chromatography*)

HU = Hidroxiuréia

ICAM-1 = Molécula intercelular de adesão 1; (*intercellular cell adhesion molecule*)

IFN = Interferon

IL = interleucina

IL 1 = Interleucina 1

IL-2 = Interleucina 2

IL-3 = Interleucina 3

IL-4 = Interleucina 4

IL-5 = Interleucina 5

IL-6 = Interleucina 6

IL-8 = Interleucina 8

IL-10 = Interleucina 10

INF- $\gamma$  = Interferon gama; (*gamma interferon*)

ISC = Células irreversivelmente falcizadas; (*irreversibly sickled cells*)

Kb = Kilo bases

KDa = Kilo Daltons

MHC = Complexo Principal de Histocompatibilidade; (*Major Histocompatibility Complex*)

mRNA = Ácido Ribonucléico mensageiro; (*Messenger ribonucleic acid*)

miRNA = Micro-RNA

NK = Células *Natural Killers*

NO = Oxido Nítrico

O<sub>2</sub> = Oxigênio

PCR = Reação da polimerase em cadeia; (*polymerase chain reaction*)

pH = "potencial hidrogeniônico", indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade

PHHF = Persistência hereditária de hemoglobina fetal

PS = Fosfatidilserina; (Phosphatidylserine)

PSGL-1 = Glicoproteína ligante 1 da P-selectina

RNA = Ácido Ribonucléico; (*ribonucleic acid*)

Saudi = Haplótipo da Arabia Saudita e India

SCD= Anemia falciforme (*sickle cell disease*)

Sen = Haplótipo Senegal

SS = Genótipo homocigoto para o alelo *HBB*\*S

STA = Síndrome torácica aguda

T = Timina

TCR = Receptor de células T

Th1 = Linfócitos T helper 1

Th2 = Linfócitos T helper 2

TNF $\alpha$  = Fator de Necrose Tumoral alfa; (*tumor necrosis factor alpha*)

TNF $\beta$  = Fator de Necrose Tumoral beta

Treg = Linfócito T reguladora

Val = Valina

VCAM-1= Fator de adesão da célula vascular 1 ; (*vascular cell adhesion factor*)

VLA-4 = Antígeno de ativação tardia-4 ; (*very late activation antigen-4*)

VO = Fenômeno vaso-oclusivo

UTR = Região não transcrita (*Untranslated Region*)

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 Hemoglobina.** Representação da estrutura quaternária da hemoglobina, possui quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias alfa e duas cadeias beta. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O<sub>2</sub>, formando o tetrâmero da Hb. [http://www.kacr.or.kr/img/gene\\_expression/hemoglobin.jpg](http://www.kacr.or.kr/img/gene_expression/hemoglobin.jpg) ..... 19
- Fig. 2. Cluster do gene beta e alfa globina nos cromossomos 11 e 16.** Representação esquemática, mostrando na parte superior o locus da beta-globina que está no cromossomo 11 e na parte inferior o locus da alfa-globina que está no cromossomo 16. Adaptado por Bank A, 2005. .... 21
- Fig. 3. Polímero de HbS.** Representação mostra que milhares de moléculas de Hb S desoxigenadas se agregam e formam feixes de polímeros. Fonte: [www.cmmr.uah.edu/protein/summary.html](http://www.cmmr.uah.edu/protein/summary.html). .... 26
- Fig. 4.** (1) O eritrócito falciforme adere ao endotélio vascular anormal; (2) Hemólise. Estes fatores resultam num estado pró-inflamatório manifestado em parte pela adesão de leucócitos (3) e agregação plaquetária (6). O aumento da endotelina-1 e seqüestro do NO pela hemoglobina livre resulta num aumento do tônus vascular (4). O estreitamento do lúmen vascular acontece secundário a proliferação de célula muscular lisa e fibroblasto na íntima (5). O resultado final é vasculopatia (7) e oclusão (8). Adaptado por Switzer e cols. 2006. .... 30
- Fig 5.** Modelo simplificado da possível interação das respostas de Th1 e Th2. *Expert Reviews in Molecular Medicine* © 2000 Cambridge University Press . [http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM2\\_09/S1462399400002143sup008.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM2_09/S1462399400002143sup008.htm) ..... 46

## LISTA DE TABELAS

### Artigo científico:

#### HLA-G POLYMORPHISM INFLUENCES THE SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

Table 1 Patients features and clinical manifestations . . . . .	93
Table 2 HLA-G genotype frequencies . . . . .	94
Table 3 HLA-G genotype and prevalence of HCV infections. . . . .	95
Table 4 Poisson regression with robust variance model and predicting variables for development of HCV infection . . . . .	96
Table 5 : +3142 genotype and respiratory tract infections . . . . .	97

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> DADOS COMPLEMENTARES. ....	103
<b>Anexo 2:</b> PROTOCOLO DE ANEMIA FALCIFORME .....	110
<b>Anexo 3:</b> TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO. ....	114

## DADOS COMPLEMENTARES

<b>Local de realização</b> .....	104
<b>População</b> .....	104
<b>Levantamento de dados clínicos dos pacientes</b> .....	105
<b>Coleta de sangue</b> .....	105
<b>Análise dos polimorfismos do promotor de IL-10</b> .....	105
<b>Procedimentos de genotipagem</b> .....	106
<b>Extração de DNA</b> .....	106
<b>Procedimentos de genotipagem</b> .....	106
<b>Resultados</b> .....	107
<b>Análise da expressão de IL-10</b> .....	107
<b>Extração de RNA</b> .....	107
<b>Síntese de cDNA</b> .....	107
<b>PCR quantitativo</b> .....	108
<b>Resultados</b> .....	109



## RESUMO

Anemia falciforme (AF) é considerada a doença monogênica mais prevalente no Brasil, e resulta de uma mutação pontual no gene da beta-globina que leva à produção de uma molécula de hemoglobina anormal (HbS). A HbS polimeriza quando submetida a baixas tensões de oxigênio, precipitando e causando a deformação dos eritrócitos pois torna rígida sua membrana plasmática que apresentará uma série de alterações e danos. Além disso, a falcemização dos eritrócitos ocasiona anemia severa, lesão de isquemia/reperfusão, superprodução de espécies reativas de oxigênio, inflamação e vaso-oclusão (VO). A VO manifesta-se clinicamente como crises de dor, ou crises vaso-oclusivas (CVOs) que pode levar ao bloqueio de vasos e capilares e ao comprometimento de órgãos. Estes pacientes possuem alta susceptibilidade a infecções, principalmente na infância. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da VO, no entanto, não estão totalmente elucidados. Estudos acerca deste tema têm sugerido que a VO seria o resultado da interação entre eritrócitos falcêmicos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e substâncias presentes no plasma dos indivíduos afetados. Tais observações como que AF seria o resultado de uma resposta inflamatória exacerbada que estes indivíduos desenvolvem, levaram à formulação da hipótese de que a anemia falciforme se comporta como uma condição inflamatória crônica e sugerindo que uma modulação do sistema imune poderá ser útil para a regulação da sintomatologia clínica. Salientando a carência de dados na literatura referentes à correlação de polimorfismos descritos para genes do sistema imune e a patofisiologia da AF, nosso estudo tem como objetivo principal:

Analisar a correlação para polimorfismos descritos para genes do sistema imune e correlacionar-lho com a patofisiologia da AF.

Sabemos que o HLA-G é uma molécula HLA não-clássica, que mostrou ser expressa em sítios de inflamação e nas doenças inflamatórias. Na região promotora além de ser altamente polimórfica, encontramos a região UTR 3' que parece desempenhar um papel importante na regulação da expressão do HLA-G. Então, dentre dos polimorfismos avaliados especificamente temos os dos genes HLA-G (14pb) e MiRNA (+3142). Nossos resultados indicam que os polimorfismos do HLA-G de 14pb e +3142 em 93 pacientes com AF, 21 pacientes apresentaram uma infecção pelo VHC e 16 pacientes com AF (22,2%) eram homozigotos para o genótipo +3142C e nenhum deles era positivo para HCV.

Nenhum dos resultados obtidos indicou qualquer tipo de imunodeficiência mas pelo contrário, sugerem a existência de uma tendência inflamatória crônica na clínica da AF. Assim fica evidente a importância do polimorfismo +3142 sobre a susceptibilidade a infecções entre os pacientes com SCD.

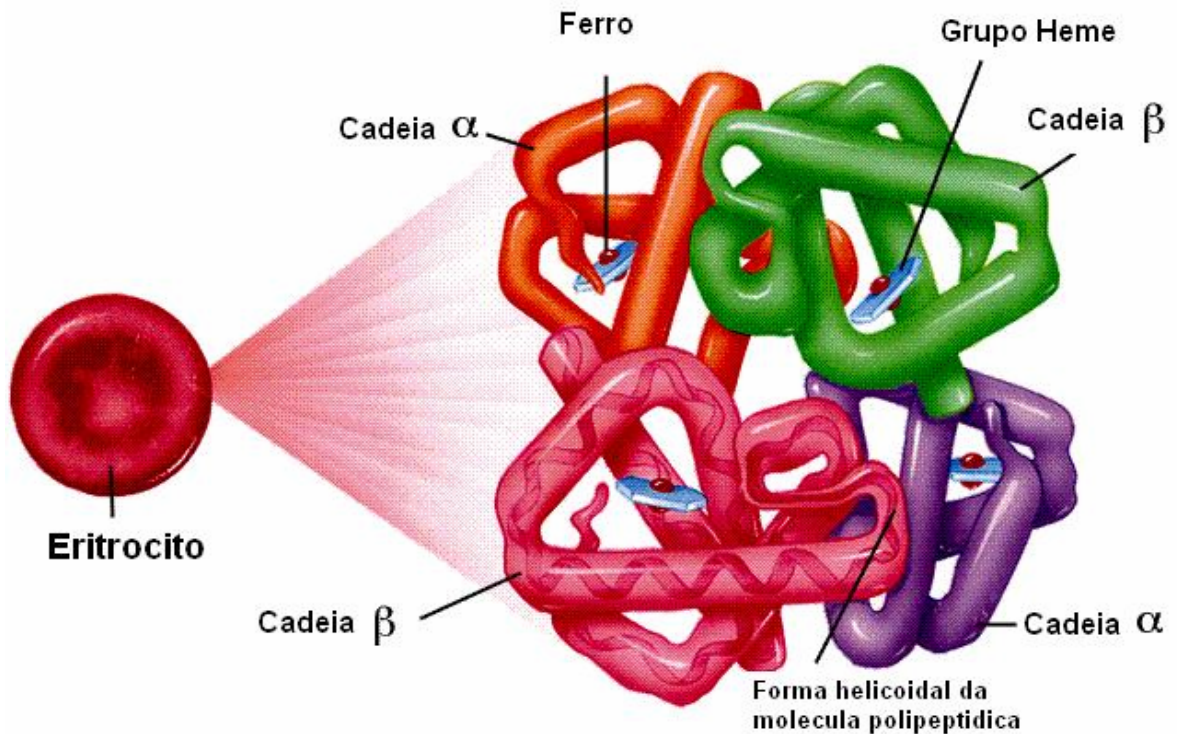
Palavras chaves: Anemia falciforme, inflamação, HLA-G, MiRNA.

## INTRODUÇÃO

### HEMOGLOBINA:

A hemoglobina (Hb) é a proteína respiratória que tem como principal função o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) por todo o organismo e está presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos <sup>1</sup>. A sua estrutura (Fig.1) é de uma proteína esferóide, globular, formada por quatro subunidades iguais duas a duas, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- $\alpha$  e zeta- $\xi$ ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- $\beta$ , delta- $\delta$ , gama- $\gamma$  e epsilon- $\epsilon$ ). Sua estrutura é quimicamente unida a um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (heme), que detém a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o  $O_2$  nos tecidos <sup>2,3</sup>. É graças à alta reatividade do ferro e grande afinidade pelo  $O_2$  que este pode ser transportado para todos os tecidos do corpo, incorporando-se em várias reações celulares e participando da produção de energia oxidativa <sup>4,5</sup>. Cada cadeia polipeptídica da globina é composta por uma seqüência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 resíduos de aminoácidos cada uma e as cadeias não-alfa, 146 resíduos.

## MOLECULA DA HEMOGLOBINA



**Fig. 1 Hemoglobina (Hb).** Representação da estrutura quaternária da hemoglobina, possui quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias alfa e duas cadeias beta. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o  $O_2$ , formando o tetrâmero da Hb. Copiado de [http://www.kacr.or.kr/img/gene\\_expression/hemoglobin.jpg](http://www.kacr.or.kr/img/gene_expression/hemoglobin.jpg)

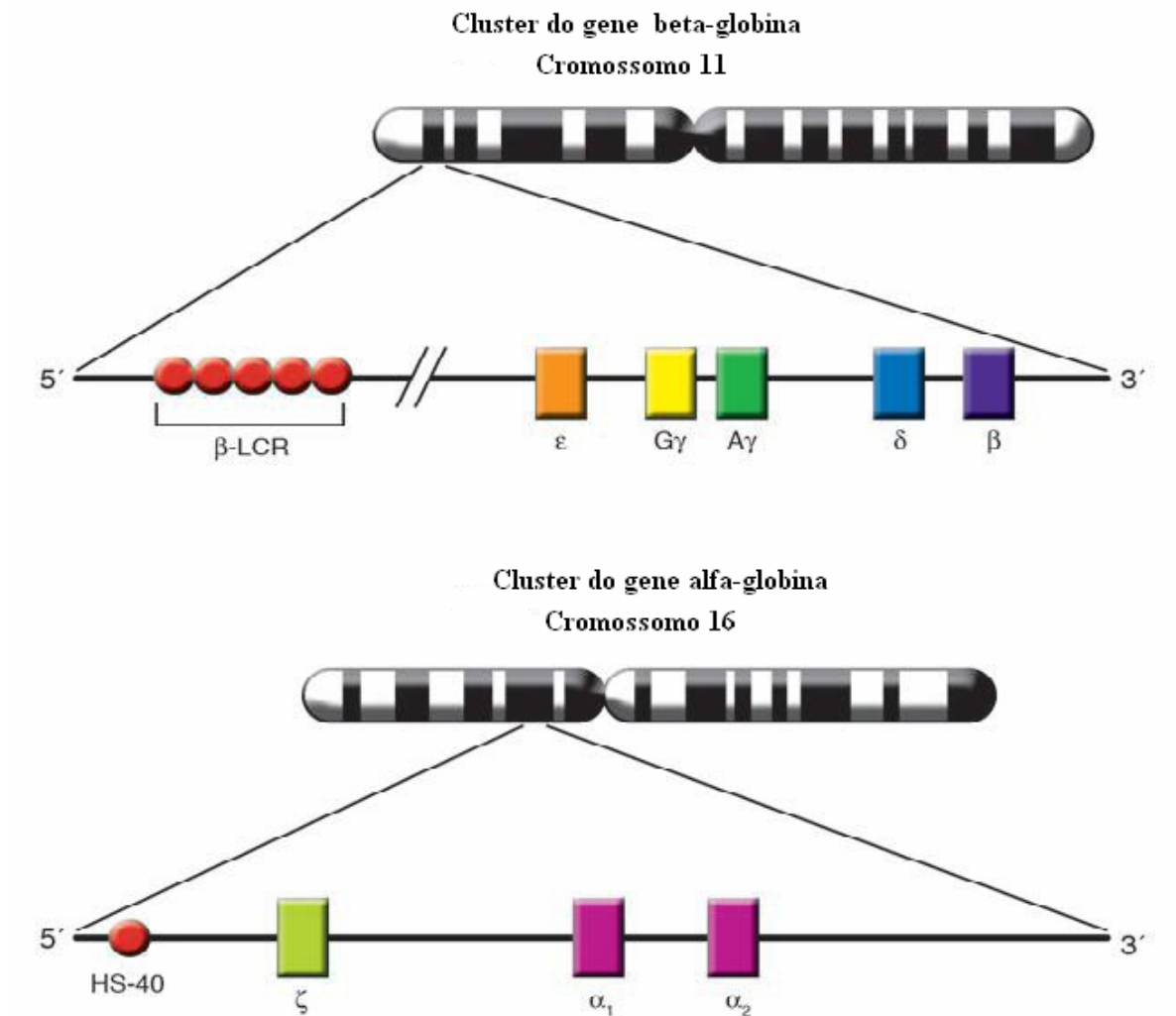
A estrutura tetramérica da Hb é essencial para o transporte de  $O_2$  assim como os movimentos cooperativos das mesmas moléculas, dando lugar a uma curva de dissociação de forma sigmóide. Nos estados oxigenado e desoxigenado a molécula tem duas conformações associadas. Na oxigenação, a estabilização da ligação entre as cadeias de globina, que se movem juntas, leva a uma maior avides pelo  $O_2$ ; a desoxigenação, o 2,3 Difosfoglicerato (2,3 DPG) e a queda do pH favorecem a diminuição da afinidade pelo  $O_2$ . Qualquer alteração estrutural

das cadeias globínicas pode interferir com o movimento molecular normal e modificar a capacidade de liberação de  $O_2$  pela Hb. Assim, na anemia o efeito na liberação tissular de  $O_2$  causado pelo baixo conteúdo da Hb é parcialmente compensado por um aumento de 2,3 DPG que leva a um aumento na capacidade de liberação de  $O_2$  pela molécula de Hb <sup>6</sup>.

Durante o desenvolvimento humano nas fases embrionária, fetal e após o nascimento, encontramos seis tipos diferentes de Hb. As hemoglobinas expressas na fase embrionária são: Gower1, Gower2 e Portland que deixam de ser produzidas no início da fase fetal quando predomina a expressão da hemoglobina fetal (HbF). À medida que se aproxima o nascimento a síntese da hemoglobina do adulto (HbA) aumenta compensando a diminuição da HbF. Ao nascer encontramos cerca de 60% de HbF e ao longo dos primeiros seis meses a HbA passa a predominar. Em adultos normais, encontramos somente 1% da HbF do total da hemoglobina <sup>7-9</sup>.

O gene da betaglobina está localizado na região cromossômica 11p15.5 com uma extensão superior a 60kb, onde se observam, no sentido 5'→3', os genes épsilon  $\epsilon$ , gama glicina  $\gamma^G$ , gama adenina  $\gamma^A$ , um pseudo-gene ( $\Psi\beta$ ) e os genes delta  $\delta$  e beta  $\beta$ <sup>10</sup>; enquanto que o gene alfa-globina está localizado na região cromossômica 16p13, num segmento de DNA de 35kb, onde localizam-se o gene zeta ( $\xi$ ), que codifica a cadeia  $\xi$  globínica, dois pseudo-genes ( $\Psi\xi$ ) e ( $\Psi\alpha$ ), e os genes alfa 1 ( $\alpha 1$ ) e alfa 2 ( $\alpha 2$ ), que, no ser humano, estão duplicados, desenvolvendo-se este fato provavelmente a duplicação gênica no decorrer do

processo evolutivo. Estes genes duplos são responsáveis pela codificação das cadeias globínicas alfa<sup>11</sup>(Fig 2).



**Fig. 2 Cluster do gene beta e alfa globina nos cromossomos 11 e 16**

Representação esquemática, mostrando na parte superior o locus da beta-globina que está no cromossomo 11 e na parte inferior o locus da alfa-globina que está no cromossomo 16. Adaptado por Bank A, 2005.

Embora essencial para a vida, por responsável pela oxigenação dos tecidos, ao longo dos milhões de anos, pressões evolutivas regionais levaram a expressão preferencial de genes anormais para as cadeias globínicas.

Os dois grupos de alterações hereditárias na molécula de Hb são as hemoglobinopatias estruturais, sendo as variantes Hb S, C e E as mais freqüentes; e as por alterações quantitativas de síntese de cadeia de globina ou talassemias, onde encontramos a talassemia alfa, beta e gama/delta/beta ou ainda a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) <sup>4,12</sup>.

Como veremos adiante, a HbS, a mais comum dentre todas pode ser encontrada no estados heterozigoto (AS) ou traço falciforme – assintomático e no qual 20 a 45% de hemoglobina é a variante, e homozigoto (SS) ou paciente que têm Anemia Falciforme (AF), com mais de 80% de HbS e quadro clínico expressivo e bastante heterogêneo <sup>13,14</sup>.

## REVISÃO DA LITERATURA

### EPIDEMIOLOGIA DA HbS

Pressões evolutivas relacionadas à malária e associadas a uma mutação de ponto, resultaram no gene da HbS. A AF é a doença hereditária monogênica mais comum em todo o mundo e, se acredita, surgiu entre os períodos paleolítico e mesolítico, há cerca de 50 a 100 mil anos, nos países do centro-oeste africano, na Índia e no leste da Ásia<sup>15,16</sup>. A HbS está presente em aproximadamente 7% na população mundial<sup>17</sup>, causando aproximadamente 3,4% de mortes nas crianças menores de 5 anos<sup>18</sup>.

Estudando 409 pacientes com AF no Rio de Janeiro, Hutz & Salzano<sup>19</sup>, observaram em 1983, que a sobrevida média deste grupo foi de 16 anos. Nos Estados Unidos, Platt e cols. (1994) estabeleceram que a idade média de óbito para portadores da doença era de 42 anos para homes e 48 anos para mulheres<sup>20</sup>. Mais recentemente, no Brasil, Loureiro & Rozenfeld em 2005, estudando pacientes entre 2000 e 2002 nos estados de Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo encontraram uma expectativa de vida entre 26.5 e 31.5 anos<sup>21</sup>.

Na America Latina 8% dos afro-descendentes têm este gene, que ocorre em 1 a cada 1000 – 4000 nascimentos de hispano-americanos<sup>22</sup>; nos Estados Unidos estima-se o nascimento de 1 indivíduo com AF em cada 800 crianças afro-descendentes<sup>23</sup>.



No Brasil, aproximadamente 2 milhões de indivíduos são portadores da HbS, sendo 8000 portadores de AF com 700 a 1000 casos novos por ano <sup>24,25</sup>. Entre afro-descendentes brasileiros, o traço falciforme é encontrado numa frequência que varia de 6,9% a 15% <sup>26</sup>. Em Porto Alegre, o traço falciforme ocorre na frequência de 1 para cada 65 nascidos vivos <sup>27</sup>.

Ao longo dos anos, tanto no Brasil <sup>21</sup> como no mundo <sup>28</sup>, a expectativa de vida destes pacientes vem aumentando com um decréscimo significativo de mortes na infância. Esta mudança está relacionada a programas bem sucedidos de triagem neonatal para hemoglobinopatias, à utilização de vacinas e antibióticos profiláticos, a utilização de hidroxiuréia (HU) e ex-sanguíneo transfusão e, sobretudo, a uma maior informação da população, particularmente pais de pacientes e professores <sup>28-30</sup>. O impacto do transplante de medula óssea, única modalidade terapêutica curativa, ainda não pode ser medido, pois a experiência mundial com esta modalidade terapêutica é ainda insipiente <sup>29</sup>.

## **PADRÃO DE HERENÇA DA ANEMIA FALCIFORME**

Descrita na literatura médica por Herrick em 1910, a AF é uma doença hereditária, monogênica, de herança codominante autossômica, ou seja, a heterozigose não causa doença mas é detectável; a homozigose ou a heterozigose combinada com outro mutante do gene da  $\beta$ -globina é necessária para a doença <sup>31</sup>. A substituição da valina pelo ácido glutâmico no sexto aminoácido da cadeia de  $\beta$ -globina ( $\beta^S$  <sup>6</sup> Glu→Val) resulta na HbS <sup>4,32</sup>. A substituição

deste aminoácido resulta da uma mutação de ponto com a substituição de uma adenina (A) por uma timina (T), **GAG→GIG** no sexto codon do gene da globina  $\beta$  33-35.

Os haplótipos têm sido marcadores úteis para estudos antropológicos e para definição do fluxo de alelo  $\beta^S$  em populações humanas. O primeiro polimorfismo associado ao gene  $\beta^S$  foi descrito por Kan & Dozy em 1978 <sup>36</sup>. O haplótipo  $\beta^S$  tem sido estudado em diferentes regiões do mundo e os clusters mais freqüentemente descritos foram denominados de acordo com a área onde predominam. São cinco os principais: Benin (Ben) associado à África Ocidental; República Centro-Africana ou Bantu (CAR) à África Oriental e Centro-Sul; Senegal (Sen) à África Atlântico Ocidental; Camarões (Cam) à Costa Ocidental Africana e Arábia Saudita e Índia (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental <sup>37,38</sup>. Embora monogênica, as manifestações clínicas da AF são extremamente variáveis de indivíduo para indivíduo não havendo um consenso na literatura sobre a relação desta variabilidade com os diferentes haplótipos <sup>33,39,40</sup>.

## **DIAGNÓSTICO DA ANEMIA FALCIFORME**

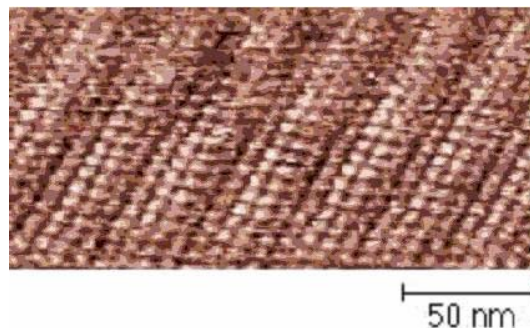
O diagnóstico da AF é firmado pela eletroforese de Hb, em acetato de celulose e pH alcalino, descrita por ocasião da descoberta da HbS por Linus Pauling em 1949 <sup>41</sup>.

Atualmente, técnicas da reação da polimerase em cadeia (PCR) e a eletroforese por HPLC (Cromatografia Líquida de alta performance) são utilizadas

para a detecção pré-natal e o *screening* neo-natal (no sangue do cordão umbilical ou teste do pezinho), respectivamente <sup>42,43</sup>.

## FISIOPATOLOGIA

O processo primário da falcização da Hemoglobina S (HbS) é a polimerização ou gelificação da desoxiHbS. A substituição do ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia polipeptídica beta, permite uma aproximação anormal entre moléculas de hemoglobina e conseqüentemente a polimerização quando desoxigenada. A formação de pontes de hidrogênio entre a valina na posição 1 ( $\beta^1$ ) e a mutada na posição 6 ( $\beta^6$ ), modifica a estrutura espacial da molécula e promove contatos intermoleculares com outros aminoácidos da globina que participam da formação do tetrâmero que é a hemoglobina polimerizada. A polimerização progride, com adição de moléculas sucessivas de HbS à medida que a porcentagem de saturação de O<sub>2</sub> da hemoglobina diminui. Os agregados maiores se alinham em fibras paralelas, formando um gel de cristais líquidos chamados tactóides <sup>44,45</sup> (Fig 3).



**Fig. 3 Polímero de HbS.** Representação mostra que milhares de moléculas de Hb S desoxigenadas se agregam e formam feixes de polímeros. Fonte: [www.cmmr.uah.edu/protein/summary.html](http://www.cmmr.uah.edu/protein/summary.html)

A formação de polímeros de HbS e sua associação com as proteínas do citoesqueleto e da membrana dos eritrócitos, dão a estes a forma de foice – característica da AF. Este fenómeno é reversível com a oxigenação, desde que a membrana da célula não esteja definitivamente alterada. Quando isto ocorre formam-se as células irreversivelmente falcizadas (ISC – Células irreversivelmente falcizadas) <sup>46</sup>, que permanecem deformadas independentemente do estado da HbS intracelular <sup>2</sup>. As propriedades de deformação das células falciformes são determinadas pela extensão da polimerização da HbS <sup>10,47</sup> e pela concentração de hemoglobina ciclêmica. A presença da HbF, por exemplo, interfere na polimerização da HbS <sup>13</sup>. Adicionalmente, o grau de desidratação celular, o pH e o tempo de trânsito dos glóbulos vermelhos na microcirculação, influenciam na polimerização <sup>44,45,48</sup>.

Depois de repetidos episódios de falcização, as células falciformes tendem a perder  $K^+$  e água, tornando-se desidratadas <sup>12</sup>. Os principais mecanismos destas perdas ocorrem pela ativação excessiva do canal de transporte dos íons potássio e cloro ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ), estimulados pela acidificação, pelo edema celular (este canal está muito ativo nos reticulócitos, onde a desidratação desempenha papel importante na formação das células densas) e pelo canal de Gardos, devido ao aumento da concentração dos íons Cálcio ( $Ca^{++}$ ) <sup>38,49,50</sup>. Isto resulta no aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) facilitando a polimerização que se intensifica com a falência da bomba de Cálcio/ATPase, alterando a permeabilidade da membrana eritrocitária, sendo esse processo deletério a principal causa dos eritrócitos que se tornam irreversivelmente falcizados.

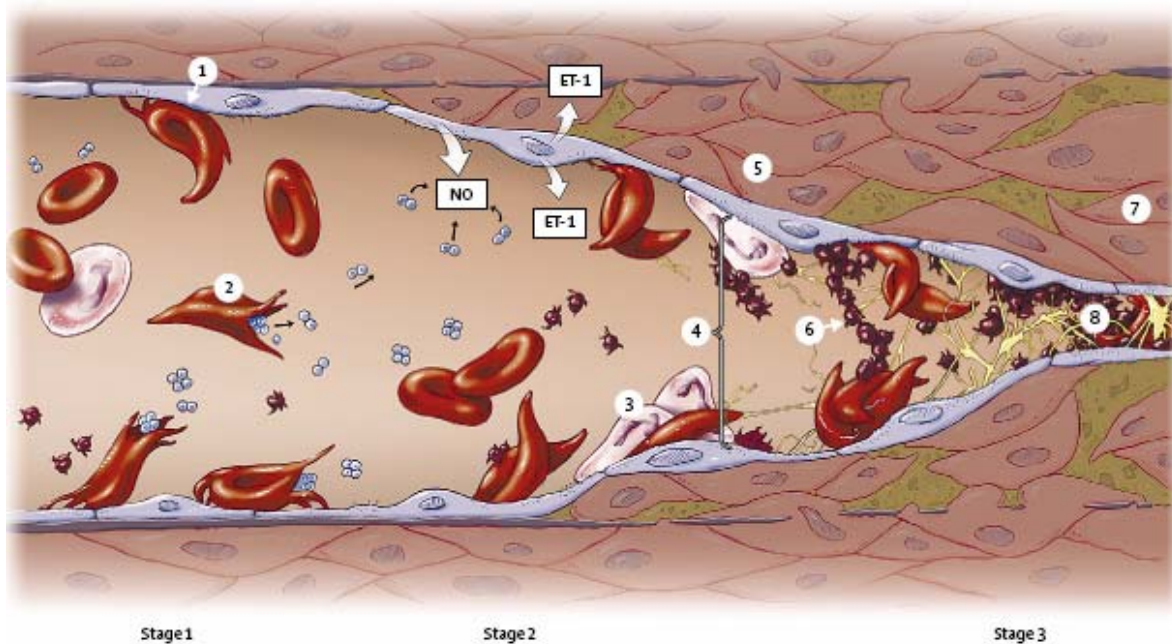
Como já ressaltado, a HbF se comporta como um importantíssimo modulador clínico atuando na inibição da polimerização da HbS<sup>51</sup>; isto também foi observado em modelos animais com AF<sup>52</sup> quando se demonstrou uma correlação positiva entre os níveis de HbF e a melhora do quadro anêmico associado a doença. A PHHF, por ser esta Hb mais ávida pelo O<sub>2</sub>, tem o potencial de diminuir o grau de deoxigenação, diminuindo assim o fenômeno de afoicamento e os sintomas agudos e crônicos da AF. Contrapondo a influência benéfica da HbF nos pacientes com AF, Inati e cols. (2003)<sup>33</sup> descreveram pacientes libaneses cujos sintomas da doença eram tão mais intensos quanto maior a concentração de HbF. Estes autores também observaram uma ausência de correlação entre os diferentes haplótipos e as manifestações clínicas neste grupo de pacientes, sugerindo a existência de outros fatores interferindo no fenótipo da AF.

O papel da rigidez dos eritrócitos falcizados, tradicionalmente considerada como necessária e suficiente para a oclusão da microvasculatura e, por conseguinte, para as manifestações veno-oclusivas características da AF, tem sido bastante discutido. Uma série de alterações em moléculas de adesão, e seu papel nos fenômenos vaso-oclusivos (VOs) foram recentemente revisados<sup>53</sup>. Foi observada a expressão anormal das proteínas como a anquirina, banda 3, espectrina, VLA-4 e CD36 na membrana celular dos reticulócitos falcêmicos; e de moléculas que promovem o aumento da adesão ao endotélio como o fator de von Willebrand, trombospondina, fibronectina, integrina  $\alpha_5\beta_3$ , ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule*), laminina, e VCAM-1 (*vascular cell adhesion factor*)<sup>23,38,54-59</sup>. O fenômeno de adesão de eritrócitos falciformes com a laminina via receptor de

BCAM/LU (*basal cell adhesion molecule*) nos pacientes com AF foi também caracterizado <sup>60</sup>. Adicionalmente, a fosfatidilserina (PS), molécula de adesão presente em maior quantidade na parte interna da membrana celular das hemácias normais, está expressa na membrana das hemácias falciformes <sup>61,62</sup>. Esta expressão confere ao glóbulo vermelho um potencial de adesão celular três vezes maior que as hemácias normais e está implicada na geração da trombina ativando a cascata da coagulação na crise VO <sup>63</sup>. Na microcirculação, a ativação das plaquetas com a expressão da P-selectina (CD62p) favorece a ligação com o endotélio e com os neutrófilos via PSGL-1 e  $\alpha_v\beta_3$  (CD61), receptor de vitronectina <sup>64</sup>. Esta ativação plaquetária aumenta ainda mais a afinidade da GP 1b-IX-V pelo fator de von Willebrand e da GP IIb-IIIa pelo fibrinogênio, retrolimentando a ativação da coagulação <sup>65-67</sup>.

A hipóxia tecidual decorrente da VO desencadeia fenômenos inflamatórios, que são tão mais intensos quanto maior a necrose tecidual. A presença de citocinas inflamatórias no microambiente lesado também aumenta a expressão de moléculas de adesão estimulando, entre outras interações, a quimiotaxia de leucócitos <sup>68,69</sup>. A lesão vascular se acentua pela liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada por estes fagócitos <sup>56</sup>.

Em modelo animal de AF, o fenômeno da veno-oclusão foi observado dinamicamente e parece acontecer a partir da adesão dos glóbulos vermelhos falcizados ou não, de leucócitos e de plaquetas entre si e no endotélio vascular <sup>53</sup> (Fig 4.) refutando a teoria antes aceita de que haveria uma obstrução mecânica pelo formato anormal do eritrócito.



**Fig. 4.** (1) O eritrócito falciforme adere ao endotélio vascular anormal; (2) Hemólise. Estes fatores resultam num estado pró-inflamatório manifestado em parte pela adesão de leucócitos (3) e agregação plaquetária (6). O aumento da endotelina-1 e seqüestro do NO pela hemoglobina livre resulta num aumento do tônus vascular (4). O estreitamento do lúmen vascular acontece secundário a proliferação de célula muscular lisa e fibroblasto na íntima (5). O resultado final é vasculopatia (7) e oclusão (8). Adaptado por Switzer e cols. 2006<sup>70</sup>.

A hemólise *per se* parece também desempenhar um papel significativo na fisiopatogenia da doença falciforme. É sabido que leva à liberacao de hemoglobina no plasma e esta converte o óxido nítrico (NO) em nitrato inativo. Paralelamente, a lise de eritrócitos libera arginase que destroi L-arginina, substrato para a produção de NO, contribuindo na diminuição da concentração de NO. O NO é importante cofator da enzima guanilato-ciclase, responsável pela conversão de GTP (trifosfato de guanósina) em cGMP (monofosfato de guanina ciclica) responsável

pelo relaxamento dos músculos lisos vasculares e vasodilatação. A baixa bioavaliabilidade de NO altera a homeostasia vascular, aumentando a ativação plaquetária e a adesão de moléculas ao endotélio, levando ao desvio do balanço constrição-relaxamento em direção a uma maior vaso-constricção, facilitando a oclusão vascular <sup>71</sup>.

## **QUADRO CLÍNICO DA ANEMIA FALCIFORME**

A AF é uma anemia hemolítica hereditária, grave, caracterizada pelo início das manifestações clínicas a partir dos 4-6 meses de vida e uma maior incidência em indivíduos da raça negra. Além da rigidez dos glóbulos vermelhos afoiçados, que contribuem para uma sobrevivência diminuída dos eritrócitos (hemólise), as alterações imunológicas e vasculares observadas nesta doença levam a uma susceptibilidade aumentada às infecções e ao comprometimento funcional dos órgãos, respectivamente. Tal morbi-mortalidade determina a diminuição na expectativa de vida dos portadores <sup>4,72</sup>.

### **Anemia**

A AF é uma anemia hemolítica com aumento da bilirrubina indireta, hiperplasia eritróide na medula óssea e elevação dos reticulócitos. O elevado *turnover* celular eritróide leva à carência de folato e aumenta a susceptibilidade a crises aplásticas, geralmente associadas à infecção <sup>73</sup>. O grau de anemia é variável de paciente para paciente, geralmente com níveis basais de Hb em torno de 7g/dl. As crises hemolíticas, o seqüestro esplênico (veja abaixo) e a aplasia podem levar



à queda abrupta destes níveis, colocando a vida dos pacientes em risco <sup>73</sup>. A anemia crônica, independentemente do componente vascular *per se* desta patologia, pode levar à insuficiência cardíaca e acentuar a deficiência funcional de vários órgãos <sup>32</sup>.

### **Síndrome Mão Pé**

Frequentemente abrindo o quadro clínico da AF, episódios de dactilite em mão e pés ocorrem em crianças a partir dos 6 meses até os 3 anos de idade. Consiste de edema, não eritematoso e doloroso, principalmente das articulações dos pequenos ossos dos pés e mãos. Pode ser acompanhada de febre e leucocitose. As alterações radiológicas são: edema de partes moles, afinamento da cortical óssea, podendo progredir para a destruição dos metacarpos, metatarsos e falanges <sup>74,75</sup>.

### **Crise Hemolítica**

Súbito aumento da anemia sem fenômenos VOs, causando insuficiência cardíaca e morte em poucas horas <sup>32</sup>.

### **Crises Dolorosas em Ossos e Articulações**

A circulação sinusoidal da medula óssea é um local ideal para a falciformação dos eritrócitos provocando isquemia. Após o primeiro ano de vida ocorrem crises dolorosas em ossos longos, coluna, costelas e articulações. Estas crises, de caráter veno-oclusivo, pode levar à infartos ósseos e edema nas articulações <sup>76</sup>. Complicação freqüente é a necrose asséptica de colo de fêmur e

de úmero, uni ou bilateral e, muitas vezes requer a substituição por próteses <sup>77</sup> . As crises dolorosas se constituem nos eventos mais freqüentes acarretando grande morbidade. Os indivíduos mais afetados costumam precisar de hospitalizações freqüentes, para analgesia intra-venosa, às vezes diversas vezes ao longo de um ano. É comum a adição a opiáceos e isto se constitui em um fator adicional na morbidade destes pacientes. As crises podem ser desencadeadas por infecções, frio ou calor acentuado, exercícios físicos ou por *stress* psíquico <sup>78</sup> .

### **Seqüestro esplênico**

A crise de seqüestro esplênico com alto risco de vida é caracterizada por súbito aprisionamento de sangue no baço, com marcada e aumento abrupto do baço, que se não tratado imediatamente pode promover sua ruptura <sup>30,79</sup> . Os múltiplos infartos esplênicos recorrentes determinam asplenia, nos primeiros 5 anos de vida <sup>24</sup> .

### **Síndrome Torácica Aguda (STA)**

Caracterizada por febre, taquipnéia, dor torácica, leucocitose e infiltrado pulmonar, a síndrome torácica aguda é a segunda causa mais comum de mortalidade na infância. De difícil diagnóstico é frequentemente confundida com pneumonia. Trata-se do aprisionamento abrupto de eritrócitos na rede vascular pulmonar com conseqüente diminuição da pO<sub>2</sub> sistêmica <sup>80,81</sup> .

### **Doença Pulmonar Crônica**

Relacionada aos repetidos episódios de trombozes, infartos, embolias gordurosas, vasculopatia e infecções. É caracterizada pela diminuição da radiotransparência, por fibrose, espessamento da íntima e a proliferação dos músculos lisos dos vasos; todas estas alterações acabam por interferir na função pulmonar determinando padrão restritivo, obstrutivo ou combinado com diminuição da capacidade vital pulmonar, das trocas gasosa com hipoxemia e acúmulo de CO<sub>2</sub> e hipertensão arterial pulmonar (HAP)<sup>82-84</sup>. A doença pulmonar crônica é uma causa de morte freqüente no adulto<sup>30</sup>.

### **Doença Biliar**

A cole-litíase é muito freqüente pela anemia hemolítica e quadros graves de colelitíase ou colédocolitíase podem representar eventos de elevada morbidade e mortalidade<sup>85,86</sup>.

### **Seqüestro Hepático**

A crise de Seqüestro Hepático, embora, menos freqüente do que a crise do seqüestro esplênico é caracterizada por súbito aumento do fígado e dor intensa no quadrante superior direito pelo aprisionamento da grande quantidade de glóbulos vermelhos nesta víscera. Casos severos podem levar à morte por rutura hepática e anemia<sup>85</sup>.

### **Doença Hepática Crônica**

Os repetidos infartos e seqüestros menores, subclínicos, na vascularização hepática acabam por determinar substituição fibrosa do parênquima. Adicionalmente, a prevalência de hepatites virais, particularmente a Hepatite C (HCV), está bastante aumentada neste grupo de pacientes submetidos a transfusões freqüentes<sup>87</sup>. O acúmulo de ferro com hemossiderose hepática vem sendo reconhecido também, como um fator muito importante na determinação da hepatopatia crônica<sup>86</sup>.

### **Doença Cardiovascular**

A cardiomegalia devido à sobrecarga cardíaca pela anemia crônica, oclusões recorrentes das arteríolas pulmonares e hemossiderose cardíaca é bastante freqüente no adulto. Estes fatores provocam dilatação e hipertrofia de ambos os ventrículos e insuficiências valvulares. Geralmente estes pacientes não apresentam doença aterosclerótica, mas podem apresentar infarto do miocárdio por oclusão coronária<sup>88</sup>.

### **Doença do Sistema Nervoso Central**

A ocorrência de acidentes vasculares cerebrais (AVC), isquêmicos e hemorrágicos, acometendo grandes e pequenos vasos cerebrais, é muito freqüente<sup>67,89</sup>. Pode se manifestar apenas como déficit cognitivo e acomete cerca de 1/3 das crianças com AF<sup>90</sup>. Nas crianças prevalecem os eventos isquêmicos enquanto que os hemorrágicos acometem os adultos<sup>32,91</sup>.

## **Doença Renal**

Alterações da função renal podem ser causadas por infartos corticais, depósito de hemossiderina no epitélio dos túbulos convolutos proximais e ainda esclerose. Pode ocorrer necrose de papila. Apresentam hiposternúria, devido à incapacidade de concentrar urina, os doentes ingerem grande quantidade de líquido. Enurese é uma queixa frequente em crianças. Apresentam também diminuição da capacidade de excretar o íon hidrogênio, acidose tubular distal, diminuição da excreção de potássio com conseqüente hipercalemia e ainda aumento da reabsorção de fosfato <sup>92</sup>. Hematúria é comum, em episódios curtos ou prolongados devido a ulcerações na pélvis renal, nos locais de infarto da papila. Pode ocorrer obstrução ureteral por coágulos. Síndrome nefrótica não é frequente, mas ocorre em adolescentes e adultos, e pode evoluir para insuficiência renal. Microalbuminúria ocorre em 46% das crianças. A insuficiência renal crônica acomete cerca de 4% de doentes <sup>30,93</sup>.

## **Doença ocular**

A retina é um local vulnerável a oclusão vascular com danos irreversíveis, secundários à proliferação de vasos e formação de anastomoses arteriovenosas. Tais alterações podem levar à hemorragia vítrea ou na câmara ocular anterior e podem, ocasionalmente, levar à perda da visão <sup>94</sup>.

## **Úlceras de Perna**

O rompimento da pele das porções distais das pernas e região maleolares é um problema comum e recorrente que afeta 75% adultos portadores de AF, sendo mais prevalentes nos homens. Decorre da veno-oclusão de vasos da derme e dificuldade de cicatrização de pequenos traumas do cotidiano <sup>83,95</sup>.

## **Deficiência no Crescimento e Desenvolvimento**

Embora normal ao nascimento as curvas de crescimento progressivamente ficam abaixo das curvas de crianças normais. A puberdade ocorre mais tardiamente, com um atraso de 2 a 3 anos em relação às meninas normais. Ao chegar à vida adulta, estes pacientes tendem a ter peso e altura quase sempre nos limites inferiores da normalidade <sup>96</sup>. Os níveis de hormônios de crescimento, tireoidianos, hormônio adenocorticotrófico (ACTH), e cortisol foram normais em uma série de pacientes, indicando um possível papel para a anemia crônica no desenvolvimento destes pacientes <sup>97</sup>.

## **Priapismo**

Pelo aprisionamento hemático nos sinusóides e corpos cavernosos do pênis, o priapismo pode complicar uma ereção normal ou mesmo ereções durante o sono. Embora geralmente autolimitado, o priapismo pode se tornar irreversível necessitando intervenção cirúrgica com conseqüente impotência sexual <sup>24,83,98</sup>.

## HCV

Hepatite C é uma inflamação do fígado causada pela infecção do flavivírus hepatotrópicos: o vírus C da hepatite (HCV)<sup>99,100</sup>. Ao contrário dos demais vírus que causam hepatite, o vírus da hepatite C não gera uma resposta imunológica adequada no organismo, o que faz com que a infecção aguda seja geralmente assintomática, e os infectados crônicos também sejam assintomáticos na maioria dos casos, caracterizando-se pela inflamação hepática persistente e progressão incidiosa de fibrose, podendo evoluir para cirrose em cerca de 20% dos casos <sup>101</sup> (WHO Hepatiti C, 1992. [cited Sept, 2006]. Available from: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>.)

A organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 3% da população mundial já foi exposta ao vírus da hepatite C. Considerando que 70-90% dos expostos se tornam portadores crônicos, há aproximadamente 170 milhões de indivíduos infectados e portanto em risco de transmitir e desenvolver hepatite crônica pelo HCV e suas complicações <sup>101</sup>, a prevalência geral da população do sul do Brasil (1-2%) <sup>102</sup>. A prevalência mundial estimada de infecção pelo vírus da hepatite C encobre variações marcantes em subgrupos de indivíduos, tais como 0,2-2% dos adultos investigados em amostras de base populacional <sup>103,104</sup>; 0,1-1,5% dos doadores de sangue <sup>105,106</sup>; 71-98% dos hemofílicos <sup>107,108</sup>; 22,9-52% dos pacientes em hemodialise <sup>109,110</sup>; 16,8-98% dos usuários de drogas injetáveis <sup>111,112</sup>; 0,8-11,5% dos homossexuais masculinos <sup>113</sup>; 0,4-6% dos trabalhadores da saúde <sup>114,115</sup>; 1,3-20,5% familiares de pacientes HCV positivos <sup>116,117</sup> e 10-35% dos pacientes com anemia falciforme <sup>87,118-123</sup>.

A transmissão perinatal do HCV é incomum, contudo é possível, com taxas de transmissão variando de 0 a 8,4% <sup>124</sup>. Há correlação entre a viremia do HCV na mãe e a subsequente infecção da criança. Além disso, uma hepatite C aguda durante a gravidez aumenta o risco de transmissão vertical do HCV para a criança <sup>125</sup>. Outro modo de contaminação pelo HCV ocorre essencialmente por exposição a sangue infectado e a través de técnicas muito sensíveis, o HCV RNA pode ser detectado em fluidos corporais como a saliva, liquido seminal, lágrima, líquor e líquido ascítico <sup>126,127</sup>.

Como vimos anteriormente as características clínicas da doença falciforme, são crises vaso-oclusivas e/ou crises hemolíticas e o que tratamento pode exigir transfusões sanguíneas e de seus derivados. Antes da década de 1990 a transfusão sanguínea era o principal modo de infecção por não ter disponível a sorologia da hepatite C nos bancos de sangue e em consequencia os pacientes ficavam expostos a esta contaminação. Este elevado risco infeccioso nos doentes falcêmicos levou a desenvolver uma melhor estratégia para aumentar a segurança da transfusão sanguínea, tendo como resultado a introdução de testes mais sensíveis e rigorosos nos procedimentos da selecção dos doadores e desta maneira a incidência de infecção pelo HCV foi significativamente reduzida, mas ainda têm um grave risco para a infecção pelo HCV <sup>128</sup>.

A prevalência da infecção do HCV nos pacientes falcêmicos está diretamente relacionada ao número de transfusões sanguíneas, e pode levar a uma infecção crônica causando doença hepática como a cirrose e fibrose do fígado nestes pacientes <sup>119</sup>.



## **Infecções**

Em pacientes com AF, a partir dos 6 meses de idade, infecção generalizada pode ser a primeira manifestação de AF <sup>32</sup>. Infecção aguda é a causa mais comum de hospitalização, embora não seja mais a principal causa de morte nos primeiros anos de vida, como nas décadas anteriores, graças ao uso profilático de antibióticos. O agente infeccioso mais prevalente destas infecções severas é o *Streptococcus pneumoniae* encontrado tanto na corrente sanguínea, como no líquido. A incidência é aproximada de 7 em 100 nas crianças com menos de 5 anos, e é de 30 a 100 vezes mais freqüente do que em crianças normais, na mesma faixa etária. Mais de 70% das meningites são causadas por *Streptococcus pneumoniae*. A partir dos 5 anos, diminui a incidência das infecções generalizadas e surgem aquelas recorrentes causadas por germes gram-negativos como *Escherichia coli*, associadas às infecções do trato urinário <sup>28</sup>.

## **Tratamento da AF**

Com o avanço no conhecimento da fisiopatogenia, e da história natural da AF, inúmeras intervenções terapêuticas têm sido aplicadas com um resultado animador traduzido pela melhoria na expectativa de vida destes pacientes. O diagnóstico precoce, nos programas de *screening* neo-natal estabelecidos em alguns países, inclusive no Brasil, propicia o atendimento precoce, à utilização de medidas educacionais e preventivas como a utilização de antibióticos profiláticos durante a infância, a vacinação precoce contra pneumococos e hepatites virais e a utilização da HU precocemente no curso da doença <sup>28-30,32</sup>. O único tratamento curativo é o transplante de medula óssea. No entanto, o conhecimento de que

vários pacientes têm uma evolução clínica mais benigna torna a escolha por esta alternativa terapêutica, de grande morbimortalidade, bastante difícil.

O tratamento com HU, um agente indutor da síntese da HbF, teria como principal efeito é a elevação dos níveis de HbF nos pacientes falcêmicos <sup>129</sup>. Estudos recentes têm demonstrado que a HU pode, também, reduzir a contagem de granulócitos, monócitos e plaquetas, e ainda reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos. Estas células, quando elevadas, são um fator de risco para a VO, pois permitem interações adesivas entre as células endoteliais e leucócitos e estimulam plaquetas a liberar citocinas que contribuem para a adesão <sup>32,50,54,62,129-134</sup>.

As manifestações clínicas da AF são, portanto, extremamente variadas. Mesmo se tratando de uma doença genética monogênica, a variabilidade clínica entre os portadores e entre as diversas fases da vida de um mesmo paciente é muito grande.

## **O SISTEMA IMUNOLÓGICO DA AF**

As infecções são a principal causa de morbi-mortalidade na AF, particularmente na infância. Neste grupo, os principais agentes infecciosos são o *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) e o *H. Influenzae* <sup>135</sup>. As infecções por pneumococos são de 30 a 200 vezes mais freqüentes nas crianças menores de cinco anos afetadas do que na população normal <sup>136</sup>. Nas crianças maiores e em adultos falciformes, o risco desenvolver infecções por germes gram-negativos, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Salmonella*, é 25 vezes maior <sup>137</sup>. Tanto nas crianças quanto nos adultos, chama à atenção a prevalência destes germes

encapsulados, sugerindo uma disfunção do sistema imunológico inato (p.e. sistema do complemento) e uma deficiência de opsonização específica (imunidade humoral). Estas deficiências poderiam ser explicadas pela disfunção esplênica observada nestes indivíduos. Pacientes esplenectomizados por rutura traumática do baço na infância apresentam riscos semelhantes.

A rede vascular peculiar do parênquima esplênico propicia a ocorrência de infartos repetidos que, inicialmente, levam a uma congestão na polpa vermelha e à esplenomegalia com seqüestro esplênico (vide abaixo); mas o acúmulo de trombos e áreas de infarto acaba por levar a uma insuficiência do órgão, culminando com atrofia e fibrose. Este fenómeno, denominado de auto-esplenectomia, ocorre geralmente até os 5 anos de idade <sup>138-140</sup>.

Ainda quanto à imunidade inata, hoje se considera que o portador de AF vive em uma situação de inflamação crônica mantendo a rede vascular permanentemente sob a influência de mediadores pró- e anti-inflamatórios em um equilíbrio precário, mesmo entre as crises agudas da doença <sup>141</sup>. O aumento da expressão das moléculas de adesão já referido, associado a graus variados de necrose tecidual recruta para o endotélio vascular granulócitos, monócitos <sup>142,143</sup>, eosinófilos, plaquetas e com estes varias outras substancias: citocinas, proteínas de fase aguda, proteínas do sistema complemento, moléculas pró-coagulantes, etc <sup>69,142-150</sup>. A liberação da endotelina-1 pelas células endoteliais, por outro lado, não apenas aumenta a expressão de moléculas de adesão <sup>151,152</sup> como estimula nos monócitos a secretar citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , e o GM-CSF; substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos

<sup>153,154</sup>. Há, portanto, várias vias de retroalimentação do processo inflamatório.

Conran e cols. (2007) <sup>155</sup>, mediram os níveis plasmáticos da citocinas pro-inflamatórias e correlacionaram com os números de leucócitos em pacientes falciformes. Embora os níveis plasmáticos de GM-CSF e IL-3 estivessem elevados, só os de GM-CSF se correlacionaram positivamente com o número total de leucócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Isto sugere um papel importante do GM-CSF na leucocitose observada na AF, mesmo entre as crises agudas da doença. Vale ressaltar que GM-CSF e IL-3 regulam a diferenciação e proliferação dos leucócitos na medula óssea.

Finalmente, citocinas tem a habilidade de regular a síntese de outras citocinas (ex: IL-1 induz a produção de TNF- $\alpha$  e vice-versa; IL-4 e IL-6 inibem a produção de TNF- $\alpha$  ou IL-1), assim como exercem uma ação moduladora na expressão de seus próprios receptores <sup>156-158</sup>.

O impacto deste estado inflamatório permanente subclínico e multifatorial, no funcionamento do sistema imunológico é muito difícil de avaliar. Não há dúvida, no entanto, sobre a sua influência na patogenia da AF.

## **IMUNIDADE ADAPTATIVA NA AF**

De uma maneira geral, existem dois tipos de resposta imunológica adquirida: a imunidade humoral e a imunidade celular. A **imunidade humoral** é mediada pelos anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos B e que têm como

principal função opsonizar com grande especificidade eliminando microorganismos extracelulares e toxinas. A **imunidade celular**, coordenada e exercida pelos linfócitos T de forma específica, atua no mecanismo de defesa contra microorganismos intra-celulares <sup>156</sup>. É graças a expansão clonal dos linfócitos efetores e a geração de linfócitos de memória, após a resolução do processo agressor, que se gera uma eficiente resposta imune.

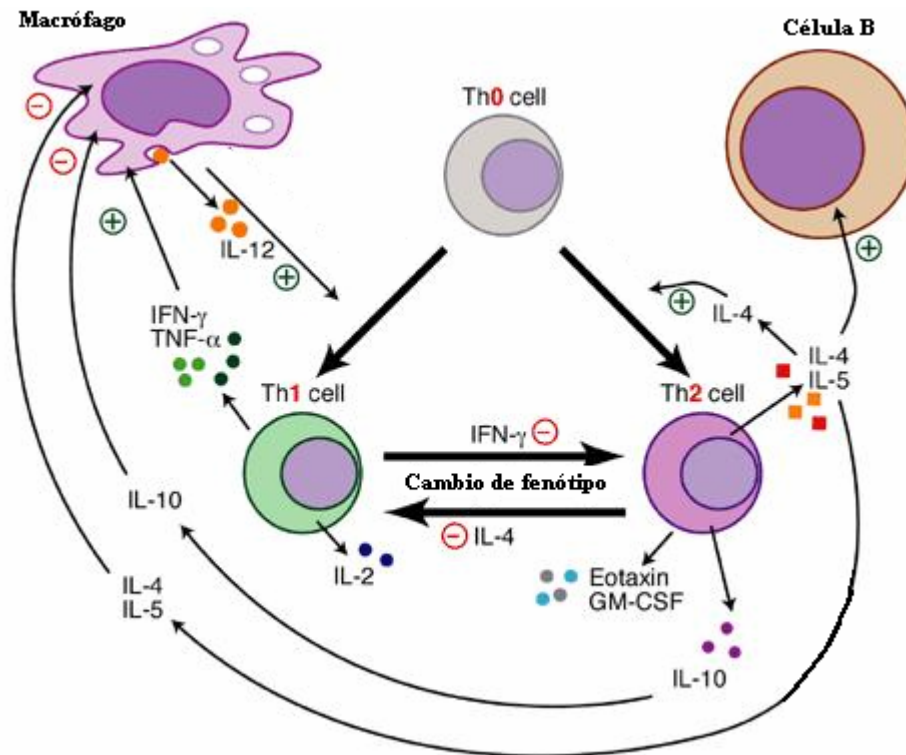
Os linfócitos T efetores são, de forma geral, divididos em dois grandes grupos ou duas classes funcionais, que detectam peptídeos antigênicos apresentados por proteínas codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).

- Linfócitos T citotóxicos ou CD8+, que reconhecem peptídeos endógenos (proteínas processadas no interior das células) apresentados pelo sistema de antígenos de histocompatibilidade (HLA – Antígeno Leucocitário Humano) de classe I, expressos em todas as células nucleadas do organismo.
- Linfócitos T auxiliares (helper) ou CD4+, estes reconhecem os peptídeos exógenos apresentados pelo HLA classe II e podem ser classificados em Th1 e Th2 <sup>159,160</sup>.

Os linfócitos T CD4+ Th1 quando ativados produzem IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha/\beta$ ; tendo características predominantemente pró-inflamatórias, estimulando a fagocitose de células infectadas pela ativação de macrófagos, ativando o sistema de complemento. A fagocitose de partículas antigênicas, por outro lado, propicia a apresentação de antígenos desencadeando

a produção de anticorpos <sup>161,162</sup>. As células Th2 são as ativadoras da resposta humoral, específica, estimulando a ativação de linfócito B e produzindo as citocinas anti-inflamatórias como IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 <sup>163</sup>. Embora com funções até certo ponto sobrepostas na resposta imune e, certamente complementares, sobretudo no que diz respeito ao estímulo direto ou indireto à produção de anticorpos, de uma maneira geral, as células Th1 e Th2 exercem, até certo ponto, funções antagônicas com relação à inflamação, a primeira estimulando e a segunda inibindo a reação inflamatória (Fig 5) <sup>161,164</sup>.

Ragupathy e cols. (2000), estudando 39 pacientes portadores de AF demonstraram níveis significativamente maiores de IL-4, portanto, um perfil predominantemente Th2 nos pacientes quando comparados aos controles. Embora sem significado estatístico, o perfil Th1 parece predominar nos pacientes com função esplênica preservada o que poderia, segundo os autores, explicar a maior resistência destes indivíduos à infecções bacterianas <sup>161</sup>. É possível que o ambiente inflamatório exacerbado no microambiente vascular de portadores de AF desencadeie uma resposta Th2 compensatória.



**Fig 5.** Modelo simplificado da possível interação das respostas de Th1 e Th2.

*Expert Reviews in Molecular Medicine* © 2000 Cambridge University Press  
[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM2\\_09/S1462399400002143sup008.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM2_09/S1462399400002143sup008.htm)

O princípio básico do sistema imunológico é ser capaz de reconhecer células ou moléculas estranhas ao organismo e com potencial patológico. A imunidade inata reconhece estes antígenos por afinidade molecular inespecífica. Alterações conformacionais sofridas pelas moléculas inatas, quando ligadas a antígenos, desencadeiam reações que recrutam fagócitos; no interior destes, o complexo molecular é exposto à radiações reativas que o destrói e os fragmentos moleculares resultantes são então processados e exteriorizados na superfície das células. Esta expressão é associada a antígenos HLA cuja classe irá definir o tipo de linfócito necessário para eliminar o agente agressor: humoral ou citotóxico.

Subgrupos destes linfócitos, apenas reconhecidos mais recentemente, têm como função a regulação da função efetora e, desta forma, restringir o processo de ativação imune à amplitude e tempo necessários, e a antígenos que representam uma ameaça à integridade do organismo.

Na última década, surgiram evidências irrefutáveis que Linfócitos T reguladores têm um importante papel na manutenção da tolerância imunológica evitando respostas imunes não essenciais ou autodestrutivas <sup>165</sup>. Os linfócitos regulatórios (supressores da resposta imune) mais bem caracterizados são  $CD4^+CD25^{(high)}FOX P3^+$  conhecidos como Treg <sup>166</sup>. Recentemente, uma nova população de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  com propriedade regulatórias foi descrita <sup>167</sup> no sangue periférico de indivíduos normais e, em maior quantidade, em locais de inflamação. Estes linfócitos expressam moléculas HLA classe Ib cujas principais isoformas são HLA-G1 e HLA-G5 (veja abaixo). Tanto os linfócitos  $TCD4^+HLA-G^+$  quanto os  $CD8^+HLA-G^+$  têm atividade supressora sobre os linfócitos T  $HLA-G^-$  além de, comparativamente a estes últimos, secretarem significativamente menos  $INF\gamma$  e IL-10; diferentemente de todos os linfócitos T, particularmente dos Treg clássicos, os T  $HLA-G^+$  não respondem à IL-2. A capacidade regulatória deste subgrupo, recém descrito, parece ser estimulada em um ambiente de inflamação e mediada de forma solúvel pela liberação da isoforma HLA-G5 no ambiente <sup>167</sup>. Interessantemente, células tumorais <sup>168</sup> e macrófagos parasitados por citomegalovirus <sup>169</sup> podem também expressar HLA-G e utilizar a capacidade imunossupressora destas moléculas para sobreviver à vigilância imunológica.



## SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDADE LEUCOCITÁRIA HUMANA (HLA)

O sistema HLA consiste num grupo de glicoproteínas da superfície celular que são codificadas por um *loci* multigênico e multialélico, extremamente polimórfico entre os indivíduos, segregado em um modelo codominante Mendeliano, localizado no braço curto do cromossomo 6 e denominado MHC <sup>170</sup>. O MHC contém cerca de quarenta genes que codificam os antígenos relacionados ao sistema HLA. Estes podem ser separados em dois grupos estruturalmente e funcionalmente distintos: Classe I e Classe II. A molécula do antígeno de Classe I é constituída por cadeia alfa-peptídica com cinco domínios e uma cadeia beta ( $\beta$ -2-microglobulina); diferindo da Classe II que se apresenta como duas cadeias polipeptídicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ), cada uma com quatro domínios <sup>171,172</sup>. Os principais genes da Classe I são o HLA-A, B e C (genes Ia), que possuem expressão variável na maioria das células somáticas e são fundamentais na apresentação de antígenos intra-celulares ou endógenos ao interagirem com linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A Classe II (HLA-D) é designada por três letras: uma para a Classe (D), uma para a família (M, O, P, Q ou R), e a terceira para especificar a cadeia polipeptídica (A, alfa; B, beta, respectivamente). Estes antígenos são expressos preferencialmente em células imunológicas tais como linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais tímicas que têm a função de apresentar antígenos ou peptídeos exógenos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> <sup>171</sup>.

O sistema HLA coordena, portanto, o reconhecimento antigênico de peptídeos endógenos ou exógenos e controla as respostas imunes, humoral e celular. Estes antígenos são processados pelos monócitos, macrófagos e células

dendríticas que atuam como Células Apresentadoras de Antígenos (APC). Os antígenos estranhos ou “não próprios” podem ser provenientes da degradação intracelular de proteínas citoplasmáticas, através da ação do proteossomo (restritos ao HLA Classe I), ou adquiridos por endocitose, a partir do meio externo celular (restrito ao HLA Classe II). Processados pelas APCs e expressos em suas membranas, eles formam complexos com o HLA e assim são apresentados aos Receptores de Células T (TCR) <sup>173</sup>. O HLA age como peça fundamental na segregação e eliminação de células auto-reativas, na fisiologia das vias de reciclagem e eliminação do “lixo celular” <sup>174</sup>, na identificação de células infectadas por vírus ou em transformação neoplásica, desempenhando um papel central na proteção do organismo e por conseguinte, na defesa imunológica.

Alvo de investigação intensa, sobretudo no cenário das doenças auto-imunes e inflamatórias, o gene HLA-G do MHC tem sido ultimamente mais bem caracterizado. Trata-se de um gene que codifica um antígeno HLA da classe Ib com uma expressão tecidual restrita, baixo polimorfismo e de 7 isoformas (HLA-G1 a 7) <sup>175</sup>. Esta molécula, embora capaz de agir como apresentadora de antígenos, tem forte propriedade inibitória agindo como um mediador da tolerância imune. Recentemente, como ressaltado acima, uma população distinta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando moléculas do HLA-G foi descrita. Como era de se esperar, os linfócitos T HLA-G<sup>+</sup> exercem uma função regulatória, imunossupressora <sup>167</sup>.

A expressão deficitária das moléculas HLA-G, tanto de membrana como na sua forma solúvel, leva a uma alteração na regulação do sistema imune e está relacionada com uma série de doenças auto-imunes. O polimorfismo decorrente

da inserção ou deleção de 14bp na região 3'UTR do HLA-G levaria a um “*splicing*” alternativo determinando a transcrição de níveis plasmáticos diferentes de HLA-G <sup>176,177</sup>. Adicionalmente, moléculas de Micro-RNA (miRNA) (veja abaixo) parecem ter um papel na regulação da expressão do HLA-G. Na região localizada na posição +3142 do gene HLA-G, ainda em 3'UTR, foi descrito um sítio de ligação para miRNA, e simultaneamente existe um polimorfismo G/C que determina afinidades diferentes a estas micro-moléculas. Por conseguinte, esta região (e os miRNAs) podem modular a supressão da tradução do RNA <sup>178</sup>. Segundo Veit e Chies <sup>179</sup> este polimorfismo poderia explicar melhor a variabilidade da expressão plasmática de moléculas de HLA-G do que o polimorfismo no *splicing* alternativo determinado pela inserção/deleção de 14pb na região 3'UTR do gene.

### **Micro-RNA (miRNA)**

Micro-RNA (miRNA) são moléculas de RNA fita simples, de 19-25 nucleotídeos, evolutivamente bem conservadas e não codificadoras de proteínas, que atuam como potentes reguladores da expressão gênica pós-transcricional de pelo menos um terço dos RNA mensageiros (mRNA), reprimindo-os ou degradando-os <sup>180</sup>. A regulação da expressão gênica mediada por miRNA é crítica para a função normal da célula. Moléculas de miRNA regulam vários processos fisiológicos incluindo a diferenciação de células tronco, a hematopoese, o desenvolvimento de músculos cardíaco e esquelético, a neurogênese, a secreção de insulina e o metabolismo do colesterol, para citar alguns. A expressão

aberrante destas micro-moléculas está implicada em uma série de doenças incluindo câncer e doenças cardíacas<sup>181-185</sup>. A presença de miRNA é instrumental para a regulação da função imunológica, inata e adaptativa, para o desenvolvimento e diferenciação das células imunes e na prevenção da auto-imunidade<sup>186,187</sup>. Em camundongos, a regulação da produção e função dos granulócitos foi relacionada ao MiRNA-223 que modularia o papel destas células na inflamação<sup>188</sup>.

## **CITOCINAS**

As citocinas representam um grupo heterogêneo de proteínas biológicas ativas ou glicoproteínas de baixo peso molecular, sinalizadoras extracelulares que promovem a interação e/ou comunicação intercelular entre as células do sistema imune, agindo através de receptores específicos localizados na superfície das células alvo<sup>189</sup>. São mediadores solúveis ativos em quantidades muito pequenas, e têm como função primária modificar o comportamento das células adjacentes induzindo o crescimento, a diferenciação, motilidade, quimiotaxia, ativação e/ou aumento da citotoxicidade das células de vários tecidos através de atuação também sobre a expressão gênica das células-alvo.

As primeiras citocinas identificadas eram produzidas por leucócitos, e, por essa razão, foram chamadas de interleucinas (IL). Imaginou-se que as IL tinham a função de intermediar ou transmitir mensagens exclusivamente entre eles. Outras citocinas conhecidas são os interferons (IFN), que podem amplificar a aptidão do sistema imunológico para reconhecer um invasor estranho ao organismo. Do

mesmo modo, as citocinas secretadas pelos monócitos (macrófagos) foram chamadas monoquinas. Temos também os TNF e os fatores de crescimento (GF). Hoje, sabe-se que todas estas citocinas podem ser produzidas por praticamente todos os tipos celulares existentes no organismo e funcionar de maneira integrada com a finalidade principal de defender o organismo <sup>190</sup>.

Outra função das citocinas é sua capacidade de regular sua própria síntese (ex: IL-1 induz a produção de TNF- $\alpha$  e vice-versa; IL-4 e IL-6 inibem a produção de TNF- $\alpha$  ou IL-1), também tem ações modulatórias na expressão dos receptores, sendo estas estimulatórias (IFN- $\gamma$  aumenta a expressão do receptor de TNF- $\alpha$ ) ou inibitórias (IL-1 diminui a expressão do receptor de TNF- $\alpha$ ). Além disso, antagonistas dos receptores podem bloquear ou reduzir o efeito da mesma citocina (ex.: IL-1RA conhecido como antagonista do receptor de IL-1) <sup>156-158</sup>.

O efeito de qualquer citocina é dependente do tempo da liberação da mesma, do local onde ela age, da presença de elementos sinergistas ou competidores, da densidade dos receptores e da responsividade tissular para cada citocina <sup>191</sup>. É de extraordinária importância reconhecer que há citocinas que atuam excitando as células de defesa produtoras da inflamação, seja diretamente, ou pelo estímulo à produção de outras citocinas.

## **INTERLEUCINA 10**

A IL-10 humana é uma estrutura homodimérica de 34 a 40 kDa, constituída por uma cadeia polipeptídica que se estrutura em quatro domínios globulares  $\alpha$ -

hélice <sup>192</sup>. Suas duas cadeias possuem 160 aminoácidos cada, com cerca de 18 kDa, unidas por pontes dissulfídicas <sup>193</sup>.

O gene da IL-10 contém cinco exons e está presente em uma única cópia no genoma, ocupando aproximadamente 5,1 kb no cromossomo 1, entre 1q31 e 1q32 <sup>192,194</sup>.

Inicialmente conhecida como Fator inibidor da síntese de citocinas, a Interleucina 10 (IL-10) ficou conhecida por sua capacidade de inibir a produção de citocinas produzidas pelas células Th1 no sobrenadante de cultivo celular de linfócitos Th2 <sup>195,196</sup>.

A IL-10, em humanos, é produzida por várias células do sistema de defesa: monócitos/macrófagos ativados, linfócitos CD4+ tanto por células tipo Th1 como Th2, linfócitos CD8+, células dendríticas, células B e queratinócitos <sup>191,197</sup>. Em humanos, os macrófagos e monócitos seriam a fonte predominante de síntese da IL-10 endógena <sup>198</sup>. Em modelos experimentais se observou que os bloqueadores dos canais de Cálcio aumentam a produção de IL-10 e diminuem os níveis de TNF- $\alpha$  <sup>191</sup>.

A IL-10 produzida pelos linfócitos é característica de resposta imune do tipo Th2, possuindo notáveis propriedades anti-inflamatórias, que incluem a capacidade de inibir a proliferação das células T, a produção do TNF e das interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 e outras propriedades imunoregulatórias como a diminuição da expressão de moléculas de MHC-I e MHC-II nas APCs. Tudo isso representa uma redução substancial na intensidade do processo inflamatório e estas citocinas medeiam resposta imune celular do perfil Th1 como IFN- $\gamma$ . Por

outro lado, a secreção da IL-10 pode reforçar a atividade imunológica, estimulando a proliferação, ativação e quimiotaxia de células T CD8+ e ativando as células *natural killers* (NK), além de estimular a produção de outras citocinas <sup>193</sup>.

Quando a IL-10 age sobre os macrófagos interrompe a resposta imune e a infecção é erradicada, deste modo, o sistema volta ao seu estado normal graças à regulação de retroalimentação negativa <sup>199</sup>.

A IL-10 suprime a inflamação por vários mecanismos, incluindo a redução da expressão de HLA classe II, redução de secreção de IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-8. Além disso, a IL-10 exerce ação anti-inflamatória por reprimir muitos efeitos biológicos do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ); das citocinas produzidas por neutrófilos e células NK e atenuar a expressão dos receptores de necrose tumoral na circulação sistêmica e inibir a atividade das APCs <sup>191,197</sup>.

As diferentes respostas da IL-10 podem ter um papel tanto protetor em relação as infecções como facilitador, já que suprime a resposta inflamatória. Exemplos disso são estudos que relatam associação de níveis elevados de IL-10 no sangue com mortalidade por doença meningocócica <sup>200</sup>, assim como níveis baixos de IL-10 aumentam o risco de síndrome da angústia respiratória aguda do adulto <sup>201</sup>.

## JUSTIFICATIVA

Sabemos que a AF é uma doença genética monogênica mais comum no Brasil e esta doença é considerada um problema de saúde pública.

A variabilidade das manifestações clínicas nestes pacientes se dá nas diversas fases da vida, isto faz com que os doentes falcêmicos se encontrem num risco elevado de desenvolver complicações clínicas que podem ser assintomáticas, leves ou muito severas; estas complicações severas podem levar a uma mortalidade precoce num período muito curto de tempo. Por isso é importante a identificação precoce de determinantes da severidade no quadro clínico destes pacientes e desta maneira teriam um manejo adequado no tratamento da doença e conseqüentemente um aumento da sobrevida e melhora da qualidade de vida.

A AF seria o resultado de uma resposta inflamatória exacerbada que estes pacientes desenvolvem, comportándose como uma doença inflamatória crônica e sugerindo que uma modulação do sistema imune poderá ser útil para a regulação da sintomatologia clínica; sendo assim temos os seguintes objetivos.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

O presente estudo tem o objetivo de analisar a correlação de polimorfismos descritos para genes do sistema imune e a patofisiologia da Anemia Falciforme

### **Objetivos Específicos**

Entre os objetivos específicos, o presente estudo realizado pretendeu:

- Estabelecer a frequência de polimorfismos descritos para variantes dos genes HLA-G e analisar uma possível correlação destas com a fisiopatologia da Anemia Falciforme;
- Analisar a taxa de expressão de IL-10, uma potente interleucina reguladora da ação inflamatória, para estabelecer correlações com a sintomatologia dos pacientes;
- Estabelecer a frequência de polimorfismos descritos para variantes do gene IL-10 e analisar uma possível correlação destas com a fisiopatologia da Anemia Falciforme

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bunn HFF, B. G. Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia, PA.: Saunders, 1986.
2. Hebbel RP. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 1991; **77** (2): 214-37.
3. Dong C, Chadwick RS, Schechter AN. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. *Biophys J* 1992; **63** (3): 774-83.
4. Weatherall DJ, Provan AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet* 2000; **355** (9210): 1169-75.
5. Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin Hematol* 2001; **38** (4): 299-306.
6. Poillon WN, Kim BC, Labotka RJ, Hicks CU, Kark JA. Antisickling effects of 2,3-diphosphoglycerate depletion. *Blood* 1995; **85** (11): 3289-96.
7. Lavelle DE. The molecular mechanism of fetal hemoglobin reactivation. *Semin Hematol* 2004; **41** (4 Suppl 6): 3-10.
8. Fathallah H, Atweh GF. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 58-62.
9. Moreira LS, de Andrade TG, Albuquerque DM, et al. Identification of differentially expressed genes induced by hydroxyurea in reticulocytes from sickle cell anaemia patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; **35** (5-6): 651-5.
10. Mohandas N, Evans E. Rheological and adherence properties of sickle cells. Potential contribution to hematologic manifestations of the disease. *Ann N Y Acad Sci* 1989; **565**: 327-37.

11. McCurdy PR, Sherman AS. Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *Am J Med* 1978; **64** (2): 253-8.
12. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; **337** (11): 762-9.
13. Smith CM, 2nd, Kuettner JF, Tukey DP, Burriss SM, White JG. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. *Blood* 1981; **58** (1): 71-7.
14. Wagner SC, Pereira C, Castro SM. Association of Hb Shelby with Hb S in the south of Brazil. *Haematologica* 2006; **91** (8): 1141-2.
15. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. WHO working group. *Bull World Health Organ* 1982; **60** (5): 643-60.
16. Neto GGC, Pitombeira dSM. Molecular aspects for sickle cell anemia. *Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; **39** (1): 51-56.
17. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ* 2001; **79** (8): 704-12.
18. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008; **86** (6): 480-7.
19. Hutz MH, Salzano FM. Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil: demographic, clinical and laboratory data. *Braz J Med Biol Res* 1983; **16** (3): 219-26.
20. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; **330** (23): 1639-44.
21. Loureiro MM, Rozenfeld S. [Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil]. *Rev Saude Publica* 2005; **39** (6): 943-9.
22. Lorey FW, Arnopp J, Cunningham GC. Distribution of hemoglobinopathy variants by ethnicity in a multiethnic state. *Genet Epidemiol* 1996; **13** (5): 501-12.

23. Wang WCL, J. N. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: Lee GR Fj, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM., ed. Wintrobe's clinical hematology. Baltimore 1999: 1346 - 1397.
24. ANVISA ANdVS. Manual de diagnostico e tratamento de doenças falciformes. Brasilia (DF), 2002.
25. Lyra IM, Goncalves MS, Braga JA, et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica* 2005; **21** (4): 1287-90.
26. Goncalves MS, Bomfim GC, Maciel E, et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2003;**36**(10):1283-8
27. Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Neto EC, Silla LM, Giugliani R. [Neonatal screening for hemoglobinopathies: a pilot study in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil]. *Cad Saude Publica* 2002; **18** (3): 833-41.
28. Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR. Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 2004; **103** (11): 4023-7.
29. Claster S, Vichinsky EP. Managing sickle cell disease. *Bmj* 2003; **327** (7424): 1151-5.
30. Ballas SK, Mohandas N. Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation* 2004; **11** (2): 209-25.
31. Herrick CJ. The Evolution of Intelligence and Its Organs. *Science* 1910; **31** (784): 7-18.
32. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal* 2008; **8**: 1295-324.

33. Inati A, Taher A, Bou Alawi W, et al. Beta-globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. *Eur J Haematol* 2003;**70**(2):79-83.
34. Steinberg MH. Genetic modulation of sickle cell anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; **209** (1): 1-13.
35. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; **151** (9): 839-45.
36. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978 **75** (11): 5631-5.
37. Antonarakis SE, Kazazian HH, Jr., Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Hum Genet* 1985; **69** (1): 1-14.
38. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 2004; **364** (9442): 1343-60.
39. Thomas PW, Higgs DR, Serjeant GR. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol* 1997; **50** (2): 121-6.
40. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105** (33): 11869-74.
41. Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; **109** (2835): 443.
42. Naoum PC. Hemoglobinopatias e Talassemias. 1 ed. São Paulo, Brasil, 1997.
43. Silla LM. [Sickle cell disease: a serious and unknown problem of public health in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 1999; **75** (3) :145-6.
44. Eaton WA, Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood* 1987; **70** (5): 1245-66.

45. Eaton WA, Hofrichter J. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 1990; **40**: 63-279.
46. Horiuchi K, Ballas SK, Asakura T. The effect of deoxygenation rate on the formation of irreversibly sickled cells. *Blood* 1988; **71** (1): 46-51.
47. Mackie LH, Hochmuth RM. The influence of oxygen tension, temperature, and hemoglobin concentration on the rheologic properties of sickle erythrocytes. *Blood* 1990; **76** (6): 1256-61.
48. Noguchi CT. Polymerization in erythrocytes containing S and non-S hemoglobins. *Biophys J* 1984; **45** (6): 1153-8.
49. Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Rev Mol Med* 2006; **8** (9): 1-23.
50. Charache S, Barton FB, Moore RD, et al. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine (Baltimore)* 1996; **75** (6): 300-26.
51. Powars DR, Chan L, Schroeder WA. The influence of fetal hemoglobin on the clinical expression of sickle cell anemia. *Ann N Y Acad Sci* 1989; **565**: 262-78.
52. Fabry ME, Suzuka SM, Weinberg RS, et al. Second generation knockout sickle mice: the effect of HbF. *Blood* 2001; **97** (2): 410-8.
53. Telen MJ. Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; **2007**: 84-90.
54. 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* 2004; **76** (4): 343-7.
55. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica* 2008; **93** (4): 605-9.

56. Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev* 2004; **18** (1): 65-73.
57. Harlan JM. Introduction: anti-adhesion therapy in sickle cell disease. *Blood* 2000; **95** (2): 365-7.
58. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 2004; **11** (2): 129-51.
59. Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood* 2001; **97** (7): 1937-41.
60. Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Semin Hematol* 2000; **37** (2): 130-42.
61. Stadius van Eps LW. Atlas of disease of the Kidney. Saulo Klahr ed. Philadelphia, 1999.
62. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* 2007; **117** (4): 850-8.
63. Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997; **100** (11 Suppl): S83-6.
64. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* 2001; **98** (6): 1955-62.
65. Graid-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* 1998; **92** (7): 2551-5.
66. Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2006; **13** (1): 34-9.
67. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 2007; **110** (6): 2166-72.

68. Redding-Lallinger R, Knoll C. Sickle cell disease--pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2006; **36** (10): 346-76.
69. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 2000; **106** (3): 411-20.
70. Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol* 2006; **5** (6): 501-12
71. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007; **21** (1): 37-47.
72. Buchanan GR, DeBaun MR, Quinn CT, Steinberg MH. Sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004: 35-47.
73. Serjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol* 2001; **112** (1): 3-18.
74. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* 1995; **86** (2): 776-83.
75. Babhulkar SS, Pande K, Babhulkar S. The hand-foot syndrome in sickle-cell haemoglobinopathy. *J Bone Joint Surg Br* 1995; **77** (2): 310-2.
76. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; **325** (1): 11-6.
77. Ejindu VC, Hine AL, Mashayekhi M, Shorvon PJ, Misra RR. Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease. *Radiographics* 2007; **27** (4): 1005-21.



78. Aguilar C, Vichinsky E, Neumayr L. Bone and joint disease in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; **19** (5): 929-41, viii.
79. Al-Rimawi HS, Abdul-Qader M, Jallad MF, Amarin ZO. Acute splenic sequestration in female children with sickle cell disease in the North of Jordan. *J Trop Pediatr* 2006; **52** (6): 416-20.
80. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med* 2000; **342** (25): 1855-65.
81. Siddiqui AK, Ahmed S. Pulmonary manifestations of sickle cell disease. *Postgrad Med J* 2003; **79** (933): 384-90.
82. Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children. *Pediatr Hematol Oncol* 2007; **24** (3): 159-70.
83. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* 2006; **107** (6): 2279-85.
84. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama* 2005; **294** (1): 81-90.
85. Ahn H, Li CS, Wang W. Sickle cell hepatopathy: clinical presentation, treatment, and outcome in pediatric and adult patients. *Pediatr Blood Cancer* 2005; **45** (2): 184-90.
86. Gurkan E, Ergun Y, Zorludemir S, Baslamisli F, Kocak R. Liver involvement in sickle cell disease. *Turk J Gastroenterol* 2005; **16** (4): 194-8.

87. Hassan M, Hasan S, Giday S, et al. Hepatitis C virus in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 2003; **95** (10): 939-42.
88. Raman SV, Simonetti OP, Cataland SR, Kraut EH. Myocardial ischemia and right ventricular dysfunction in adult patients with sickle cell disease. *Haematologica* 2006; **91** (10): 1329-35.
89. Morris CR. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; **2008**: 177-85.
90. Routhieaux J, Sarcone S, Stegenga K. Neurocognitive sequelae of sickle cell disease: current issues and future directions. *J Pediatr Oncol Nurs* 2005; **22** (3): 160-7.
91. Wang WC. The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 2007; **14** (3): 191-7.
92. Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; **5** (3): 475-93.
93. Scheinman JI. Sickle cell disease and the kidney. *Nat Clin Pract Nephrol* 2009; **5** (2): 78-88.
94. Morel C. [Retinal involvement in hemoglobinopathy]. *J Fr Ophtalmol* 2001; **24** (9): 987-92.
95. Halabi-Tawil M, Lionnet F, Girot R, Bachmeyer C, Levy PP, Aractingi S. Sickle cell leg ulcers: a frequently disabling complication and a marker of severity. *Br J Dermatol* 2008; **158** (2): 339-44.
96. Reed JD, Redding-Lallinger R, Orringer EP. Nutrition and sickle cell disease. *Am J Hematol* 1987; **24** (4): 441-55.

97. Singhal A, Thomas P, Cook R, Wierenga K, Serjeant G. Delayed adolescent growth in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 1994; **71** (5): 404-8.
98. Addis G, Spector R, Shaw E, Musumadi L, Dhanda C. The physical, social and psychological impact of priapism on adult males with sickle cell disorder. *Chronic Illn* 2007; **3** (2): 145-54.
99. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; **13** (17): 2436-41.
100. McHutchison JG. Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care* 2004; **10** (2 Suppl): S21-9.
101. WHO. Hepatitis C, 1992. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>.
102. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38** (1): 41-9.
103. Mendez-Sanchez N, Ponciano-Rodriguez G, Chavez-Tapia NC, et al. Prevalence of hepatitis C infection in a population of asymptomatic people in a checkup unit in Mexico city. *Dig Dis Sci* 2005; **50** (4): 733-7.
104. Zarife MA, Silva LK, Silva MB, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; **100** (7): 663-8.
105. Offergeld R, Ritter S, Faensen D, Hamouda O. [Infection epidemiological data among blood donors in Germany 2003-2004. Report of the Robert Koch Institute in accordance with Article 22 of the Transfusion Act]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2005; **48** (11): 1273-87.

106. Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis* 2003; **7** (4): 262-7.
107. Maor Y, Bashari D, Kenet G, et al. Hepatitis C at the israeli national hemophilia center. *Haemophilia* 2006; **12** (1): 68-74.
108. Yee TT, Griffioen A, Sabin CA, Dusheiko G, Lee CA. The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut* 2000; **47** (6): 845-51.
109. Medeiros MT, Lima JM, Lima JW, Campos Hde H, Medeiros MM, Coelho Filho JM. [Prevalence and associated factors to hepatitis C in hemodialysis patients in Brazil]. *Rev Saude Publica* 2004; **38** (2): 187-93.
110. Selcuk H, Kanbay M, Korkmaz M, et al. Distribution of HCV genotypes in patients with end-stage renal disease according to type of dialysis treatment. *Dig Dis Sci* 2006; **51** (8): 1420-5.
111. Roy K, Hay G, Andragetti R, Taylor A, Goldberg D, Wiessing L. Monitoring hepatitis C virus infection among injecting drug users in the European Union: a review of the literature. *Epidemiol Infect* 2002; **129** (3): 577-85.
112. Oliveira ML, Hacker MA, Oliveira SA, et al. "The first shot": the context of first injection of illicit drugs, ongoing injecting practices, and hepatitis C infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica* 2006; **22** (4): 861-70.
113. Jin F, Prestage GP, Kippax SC, Kaldor JM, Dore GJ, Grulich AE. Prevalence and risk factors of hepatitis C in HIV-negative homosexual men in Sydney, Australia. *Aust N Z J Public Health* 2005; **29** (6): 536-9.

114. Proietti L, Malaponte G, Libra M, et al. Analysis of hepatitis C virus infection among health-care workers: an observational study. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005; **51** (3): 255-9.
115. Takahama AJ, Tatsch F, Tannus G, Lopes MA. Hepatitis C: incidence and knowledge among Brazilian dentists. *Community Dent Health* 2005; **22** (3): 184-7.
116. Keiserman DR, Both CT, Mattos AA, Remiao J, Alexandre CO, Sherman KE. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus in patients with hepatitis C and human immunodeficiency virus coinfection. *Am J Gastroenterol* 2003; **98** (4): 878-83.
117. Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. *J Viral Hepat* 2000; **7** (2): 93-103.
118. DeVault KR, Friedman LS, Westerberg S, Martin P, Hosein B, Ballas SK. Hepatitis C in sickle cell anemia. *J Clin Gastroenterol* 1994; **18** (3): 206-9.
119. Hasan MF, Marsh F, Posner G, et al. Chronic hepatitis C in patients with sickle cell disease. *Am J Gastroenterol* 1996; **91** (6): 1204-6.
120. Arruda VR, Eid KA, Zen GC, Goncales NS, Saad ST, Costa FF. Hepatitis C antibody (anti-HCV) prevalence in Brazilian patients with sickle cell diseases. *Vox Sang* 1993; **65** (3): 247.
121. Hassan M, Hasan S, Castro O, Giday S, Banks A, Smoot D. HCV in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 2003; **95** (9): 864-7, 872-4.
122. Adewuyi JO. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among normal blood donors and multi-transfused sickle-cell anaemia patients in Nigeria. *Trop Doct* 1996; **26** (1): 29-30.

123. Torres MC, Pereira LM, Ximenes RA, et al. Hepatitis C virus infection in a Brazilian population with sickle-cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003; **36** (3): 323-9.
124. Thomas SL, Newell ML, Peckham CS, Ades AE, Hall AJ. A review of hepatitis C virus (HCV) vertical transmission: risks of transmission to infants born to mothers with and without HCV viraemia or human immunodeficiency virus infection. *Int J Epidemiol* 1998; **27** (1): 108-17.
125. Bortolotti F, Resti M, Giacchino R, et al. Changing epidemiologic pattern of chronic hepatitis C virus infection in Italian children. *J Pediatr* 1998; **133** (3): 378-81.
126. Liou TC, Chang TT, Young KC, Lin XZ, Lin CY, Wu HL. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992; **37** (3): 197-202.
127. Mendel I, Muraine M, Riachi G, et al. Detection and genotyping of the hepatitis C RNA in tear fluid from patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 1997; **51** (3): 231-3.
128. Ocak S, Kaya H, Cetin M, Gali E, Ozturk M. Seroprevalence of hepatitis B and hepatitis C in patients with thalassemia and sickle cell anemia in a long-term follow-up. *Arch Med Res* 2006; **37** (7): 895-8.
129. Steinberg MH, Barton F, Castro O, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *Jama* 2003; **289** (13): 1645-51.
130. Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of

- polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood* 2002; **99** (7): 2297-303.
131. Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, et al. NIH consensus development statement on hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *NIH Consensus State Sci Statements* 2008; **25** (1): 1-30.
132. Covas DT, de Lucena Angulo I, Vianna Bonini Palma P, Zago MA. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica* 2004; **89** (3): 273-80.
133. de Montalembert M, Belloy M, Bernaudin F, et al. Three-year follow-up of hydroxyurea treatment in severely ill children with sickle cell disease. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; **19** (4): 313-8.
134. Papassotiriou I, Voskaridou E, Stamoulakatou A, Loukopoulos D. Increased erythropoietin level induced by hydroxyurea treatment of sickle cell patients. *Hematol J* 2000; **1** (5): 295-300.
135. Steinberg MH. Pneumococcus and sickle cell disease: the beginning of the end? *Clin Infect Dis* 2007; **44** (11): 1434-5.
136. Wong WY, Overturf GD, Powars DR. Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. *Clin Infect Dis* 1992; **14** (5): 1124-36.
137. Elbashier AM, Al-Salem AH, Aljama A. Salmonella as a causative organism of various infections in patients with sickle cell disease. *Ann Saudi Med* 2003; **23** (6): 358-62.

138. Lane PA. Sickle cell disease. *Pediatr Clin North Am* 1996; **43** (3): 639-64.
139. Durosinmi MA, Salawu L, Ova YA, Lawal OO, Fadiran OA. Haematological parameters in sickle cell anaemia patients with and without splenomegaly. *Niger Postgrad Med J* 2005; **12** (4): 271-4.
140. Zago MA, Bottura C. Splenic function in sickle-cell diseases. *Clin Sci (Lond)* 1983; **65** (3): 297-302.
141. Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 2001; **57** (1): 46-50.
142. Hebbel RP, Schwartz RS, Mohandas N. The adhesive sickle erythrocyte: cause and consequence of abnormal interactions with endothelium, monocytes/macrophages and model membranes. *Clin Haematol* 1985; **14** (1): 141-61.
143. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 2000; **96** (7): 2451-9.
144. Larsen GL, Holt PG. The concept of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162** (2 Pt 2): S2-6.
145. Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp Hematol* 2004; **32** (8): 728-34.
146. Anyaegbu CC, Okpala IE, Aken'ova AY, Salimonu LS. Complement haemolytic activity, circulating immune complexes and the morbidity of sickle cell anaemia. *Apmis* 1999; **107** (7): 699-702.



147. Wilson WA, Thomas EJ, Sissons JG. Complement activation in asymptomatic patients with sickle cell anaemia. *Clin Exp Immunol* 1979; **36** (1): 130-9.
148. Mohamed AO, Hashim MS, Nilsson UR, Venge P. Increased in vivo activation of neutrophils and complement in sickle cell disease. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **49** (6): 799-803.
149. Setty BN, Stuart MJ. Eicosanoids in sickle cell disease: potential relevance of neutrophil leukotriene B4 to disease pathophysiology. *J Lab Clin Med* 2002; **139** (2): 80-9.
150. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol* 2005; **113** (2): 130-6.
151. Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* 2005; **130** (6): 943-53.
152. Shiu YT, Udden MM, McIntire LV. Perfusion with sickle erythrocytes up-regulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Blood* 2000; **95** (10): 3232-41.
153. McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr Opin Hematol* 2003; **10** (2): 150-8.
154. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99** (5): 3047-51.

155. Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2007; **86** (4): 255-61.
156. Abbas AKLAHP, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro, 2005.
157. Curfs JH, Meis JF, Hoogkamp-Korstanje JA. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997; **10** (4): 742-80.
158. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998; **16** (5-6): 457-99.
159. Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. A single antigen-specific B cell can conjugate to either a type 1 or a type 2 helper T cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85** (20): 7724-8.
160. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 145-73.
161. Raghupathy R, Haider MZ, Azizieh F, Abdelsalam R, D'Souza TM, Adekile AD. Th1 and Th2 cytokine profiles in sickle cell disease. *Acta Haematol* 2000; **103** (4): 197-202.
162. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136** (7): 2348-57.
163. Garside P, Mowat AM. Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol Today* 1995; **16** (5): 220-3.

164. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* 2002; **30** (1 Suppl): S58-63.
165. Baecher-Allan C, Hafler DA. Suppressor T cells in human diseases. *J Exp Med* 2004; **200** (3): 273-6.
166. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; **6** (4): 338-44.
167. Feger U, Tolosa E, Huang YH, et al. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood* 2007; **110** (2): 568-77.
168. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95** (8): 4510-5.
169. Onno M, Pangault C, Le Fric G, Guilloux V, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2000; **164** (12): 6426-34.
170. Carbone FR, Strom BM. Major histocompatibility complex control of T cell recognition. 2nd ed. New York, NY: Raven, 1989.
171. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; **343** (10): 702-9.
172. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000; **343** (11): 782-6.

173. Van den Eynde BJ, Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 2001; **13** (2): 147-53.
174. Chao NJ. Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; **10** (4): 215-23.
175. Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol Today* 2000; **21** (11): 532-4.
176. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008; **72** (4): 335-41.
177. Borghi A, Fogli E, Stignani M, et al. Soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in plasma of psoriatic patients: preliminary study on a possible correlation between generalized immune status, treatments and disease. *Arch Dermatol Res* 2008; **300** (10): 551-9.
178. Tan Z, Randall G, Fan J, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 2007; **81** (4): 829-34.
179. Veit TD, Chies JA. Tolerance versus immune response - MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* 2009; **20** (4): 229-31.
180. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6** (5): 376-85.
181. Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65** (4): 545-62.

182. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6** (4): 259-69.
183. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; **6** (11): 857-66.
184. Sethupathy P, Collins FS. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet* 2008; **24** (10): 489-97.
185. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; **449** (7163): 682-8.
186. Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1143**: 226-39.
187. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* 2009; **136** (1): 26-36.
188. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008; **451**(7182):1125-9.
189. Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil* 2005; **26** (1): 7-12.
190. Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004; **28** (5): 375-94.
191. Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998; **27** (6): 1497-507.
192. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683-765.

193. Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; **79** (6): 469-83.
194. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; **46** (2): 120-8.
195. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; **170** (6): 2081-95.
196. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990; **248** (4960): 1230-4.
197. Kang SS, Allen PM. Priming in the presence of IL-10 results in direct enhancement of CD8+ T cell primary responses and inhibition of secondary responses. *J Immunol* 2005; **174** (9): 5382-9.
198. Wanidworanun C, Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993; **151** (12): 6853-61.
199. Choi KM, Ryu OH, Lee KW, et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; **75** (2): 235-40.
200. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet* 1997; **349** (9046): 170-3.

201. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164** (10 Pt 1): 1896-903.
202. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19** (19): 5444.
203. Goodstadt L, Ponting CP. CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics* 2001;**17**(9):845-6.
204. Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res* 1993; **21** (14): 3269-75.

## HLA-G POLYMORPHISM INFLUENCES THE SUSCEPTIBILITY TO INFECTIONS IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

<sup>1,4</sup> Elvira Alicia Aparicio Cordero, <sup>2,4</sup> Tiago Degani Veit, <sup>3</sup> Maria Aparecida Lima da Silva, <sup>2</sup> Sidia Maria Callegari Jacques, <sup>2</sup> José Artur Bogo Chies, <sup>3</sup> Lúcia Mariano da Rocha Silla.

<sup>1</sup>Post-Graduation Program in Medical Sciences, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Hematology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Both authors contributed equally to this work

Corresponding author :

José Artur Bogo Chies

Department of Genetics, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15053 Zip Code 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil. Phone+55-51-3308-6740. Fax: +55-51-3308-7311.

E-mail: [jabchies@terra.com.br](mailto:jabchies@terra.com.br)

Short running title: HLA-G polymorphisms in Sickle Cell Disease



## **ABSTRACT**

In spite of its well known monogenic etiopathogenesis, Sickle Cell Disease (SCD) is characterized by a striking variability of clinical presentation. There is growing evidence that genetic factors may be involved in this variability. HLA-G is a non-classical HLA molecule which was shown to be expressed at sites of inflammation and in inflammatory diseases. Besides its large and highly polymorphic promoter region, the 3' UTR region seems to play an important role on regulating HLA-G expression. In this study, we investigated the influence of the 14pb and the +3142 HLA-G polymorphisms on 93 SCD patients in order to evaluate its potential role on clinical parameters. Twenty-one patients presented an HCV infection. Among all SCD patients 16 (22.2%) were homozygous for the +3142C genotype, none of them HCV positive. Controlling by blood transfusion episodes, the C allele represented a protection factor for HCV infection which was shown to be dose-dependent (RR = 0.41 CI95% 0.24-0.71). The +3142C allele was also underrepresented among patients with history of respiratory-tract infections. Our results support a role of the +3142 polymorphism on the susceptibility to infections among SCD patients.

## **KEYWORDS**

Sickle Cell Disease, HLA-G, polymorphism, HCV infection

## INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is the most common hereditary illness in the world, affecting mainly people of African ancestry <sup>1</sup>. The illness is characterized by a mutation in the sixth codon of the beta hemoglobin <sup>2</sup> gene which results in the substitution of valine for glutamic acid in position six of beta chain of the hemoglobin, with the resulting abnormal hemoglobin (Hb S) responsible for alterations in the erythrocytes that culminate with the obstruction of the microcirculation, ischemia, tecidual necrosis and organic dysfunction <sup>3,4</sup>. In spite of its well known monogenic etiopathogenesis, SCD is characterized by a striking variability of the clinical presentation ranging from an early-onset life-threatening disease to a milder condition compatible with an almost normal life course. Unpredictability of the major complications is also a characteristic feature of this disease. Although environmental factors undoubtedly play a role in this variability, there is growing evidence that genetic factors may be involved as well. For instance, recent studies have focused on the immunogenetic modulation of both innate and adaptive immune responses <sup>5-7</sup>. Particularly, it has been reported that both classical and non classical HLA alleles might play a role on the susceptibility to infections in SCD patients <sup>8,9</sup>.

HLA-G is a non-classical HLA molecule, characterized by limited polymorphism, by the expression of both membrane-bound and soluble isoforms and by its limited tissue distribution under normal physiological conditions. However, this molecule was shown to be largely expressed at sites of inflammation and in inflammatory diseases <sup>10-13</sup>, being able to mediate the inhibition of the cytotoxic activity of NK- and CD8 T-cells and affect CD4 T-cell functions and dendritic cell maturation <sup>14</sup>. Therefore, it was suggested that HLA-G plays an important role in regulating the immune response in these conditions. The regulation of HLA-G gene expression seems to be complex and is yet poorly understood. Besides its large and highly polymorphic promoter region, the 3' UTR region seems to play an

important role on regulating HLA-G expression. A 14bp insertion/deletion polymorphism located at this region (rs16375) was shown to play a role on alternative splicing and was also associated with different levels of HLA-G in plasma <sup>15,16</sup>. This polymorphism has been shown to be associated to as a susceptibility factor to some inflammatory diseases <sup>10,12,17-22</sup>. Another polymorphism located at this region, at the position +3142 (rs1063320), is thought to influence miRNA binding, thus influencing RNA turnover and miRNA-mediated repression of translation <sup>23</sup>. This same study has reported an association between this polymorphism and asthma susceptibility. It was previously suggested by our group that this polymorphism might explain better the differences observed in HLA-G protein expression in plasma than the 14bp polymorphism <sup>24</sup>. In this study, we investigated the influence of these two polymorphisms on SCD disease course.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study population**

The patients with sickle cell disease (SCD) were recruited at the Hemoglobinopathy Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Of these, 93 participated in the study (45 men and 48 women). Patient data (sex, age, ethnic origin, clinical manifestations, hematological parameters, etc) were obtained from their medical records.

The control group comprised 259 healthy individuals from the urban population of Porto Alegre and Rio de Janeiro with the same ethnic origin of the patients. The study protocol was approved by the Medical Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil and informed consent was obtained from all patients.

### **Genotyping of the HLA-G gene polymorphisms**

DNA was isolated from peripheral blood cells using a salting-out procedure<sup>25</sup>. For the PCR (Polymerase chain reaction) analysis of the +3142 polymorphism, 200 ng of genomic DNA were added to a final volume of 25  $\mu$ L, with final concentrations as follows: PCR buffer 1X, 2.0mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2mM of each dNTP; 1.0 unit of *Taq*-polymerase and 10pmol of each primer (GMIRNAF -5'- CATGCTGAACTGCATTCTCC-3', GMIRNAR - 5' CTGGTGGGACAAGGTTCTACTG -3'). Thermocycling conditions were: 94°C for 5 min; 32 cycles of 94°C for 30 s, 65.5°C for 30 s and 72°C for 60s followed by a final extension step at 72°C for 5min. The amplified PCR products were cleaved with 3U of *Bae*I (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) at 37°C for three hours, according to manufacturer's instructions. RFLP products were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The C allele yielded an intact fragment of 406bp while the G allele yielded fragments of 316 and 90bp. The 14-bp polymorphism at exon 8 of HLA-G gene was detected through PCR analysis as previously described<sup>26</sup>. Briefly, 200 ng of genomic DNA were added to a final volume of 25  $\mu$ L, with final concentrations as follows: PCR buffer 1X, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 0.4mM of each dNTP; 1 unit of *Taq*-polymerase and 10pmol of each primer. Thermocycling conditions were adapted to 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 s, 64°C for 60 s and 72°C for 60s followed by a final extension step at 72°C for 10min. The amplified PCR products were analyzed by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

### **Statistical analysis**

HLA-G genotypic frequencies were compared to Hardy–Weinberg expectations using Chi-Square tests. HLA-G allelic frequencies and HLA-G genotypes of controls and SCD

patients were compared using the  $\chi^2$  test (with Yates correction when necessary). Bonferroni correction for multiple comparisons was applied when the *P* value was significant. Poisson Regression with robust variance was applied when controlling for multiple variables. The significance level was set at  $\alpha = 0.05$  (two-tailed) and all statistical analyses were performed with SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and winPEPI <sup>27</sup>.

## RESULTS

Ninety-three SCD patients (45 women and 48 men) were genotyped for the HLA-G polymorphisms. The mean patient's age was  $27.3 \pm 12.2$  years. Eighty-eight patients were under treatment with Hydroxyurea (HU) by the time of analysis. Further details about the patient's clinic status are displayed on Table 1. The allelic and genotypic frequencies observed in the patients group were similar to those obtained in a control group composed by African-descendent individuals (Table 2) and both groups did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Twenty-one SCD individuals (23%) were infected with HCV, a frequency similar to other studies with SCD patients <sup>28-34</sup>, but much higher than the expected prevalence on the general Southern Brazilian population (1-2%) <sup>35</sup>. Remarkably, none of these patients was homozygous for the +3142C allele (CC) as compared to 16 individuals (22%) from the group without HCV. The allelic frequency of the C allele was lower in the infected group as compared to the HCV-negative group (respectively 21.4% and 48.6%,  $P=0.003$ ) (Table 3). Interestingly, while none of the CC individuals was in the HCV infected group, 20% of the heterozygous and 40% of the patients homozygous for the G allele (GG) were in the infected group (linear trend  $\chi^2 = 7.467$   $P = 0.006$ ), which lead us to think of a dose effect associated to this polymorphism on the susceptibility to HCV infection. A Poisson regression model (controlling for blood transfusion events during one year of observation)

was performed to assess this hypothesis. According to it, GG patients have a risk 2.4 and 5.8 times higher of acquiring an HCV infection as compared to heterozygous and CC patients, respectively (Model  $P > 0.0001$ , Table 4). No differences were observed between infected and non-infected subjects concerning the 14bp polymorphism (Table 3).

Forty-eight patients presented a history of respiratory tract affections (upper respiratory tract infections, bronchopneumonia, asthma and/or rhinitis/sinusitis – Table 1). Moreover, among them 42 (87.5%) had presented at least one episode of bronchopneumonia and/or other upper respiratory tract infection. When considering bronchopneumonia and upper respiratory tract infections separately, we observed that in both groups there was a decreased frequency of the CC genotype (although not significant). Also, it is interesting to point out that none of the 16 patients with upper respiratory tract infections presented the CC genotype (Table 5). This association yielded a significant P-value when considering both bronchopneumonia, upper respiratory tract infections as a single group ( $P=0.040$ ), although not significant after correcting for multiple comparisons ( $P=0.12$  – Table 5). No differences were observed when considering the 14bp polymorphism alone or both polymorphisms as haplotypes (data not shown).

We also evaluated a potential influence of the HLA-G genotype on hematological parameters, such as adult and fetal Hb levels, leukocyte and platelet counts, and bilirubin and LDH (lactate dehydrogenase) levels. No differences were observed between these parameters and the polymorphisms analyzed. To evaluate a potential interference of the HLA-G genotype on the effect of HU, we compared the above-mentioned parameters before and after HU treatment. Again, no significant differences were observed among genotypes and haplotypes considering the two HLA-G polymorphisms (data not shown).

## DISCUSSION

In this work, we assessed the influence of two polymorphisms located at the 3'UTR of the HLA-G gene on the clinical features of SCD patients. Although being a disease of monogenic inheritance, the marked variability of symptoms in SCD has led to the search for genetic features that could explain, at least partially, such clinical differences. A marked feature in SCD patients is the high prevalence of recurrent infections. It has been proposed that SCD is a chronic inflammatory condition and that the high occurrence of infections is not due to any immunodeficiency, but rather to this status of chronic inflammation<sup>36,37</sup>. Since associations between both classical and non-classical HLA molecules and disease outcome in SCD patients have been reported by previous studies and since HLA-G is a molecule that interferes in both innate and adaptive immunity, it constitutes an interesting target to be evaluated on SCD course.

In our cohort, 23% of the patients were positive for HCV and, of those patients, 86% had previous history of at least one blood transfusion. Because SCD patients are at a higher risk of blood transfusions, due to their frequent episodes of hemolytic anemia, they constitute a risk group for HCV (and other diseases transmitted by blood derivatives). Still, in spite of entering the human body, the HCV virus encounters resistance to its establishment by the host's immune system, and this resistance, according to our results, seems to be partially dependent on the HLA-G genotype. As previously shown, no patients homozygous for the C allele were found in the HCV infected group and, conversely, the frequency of homozygotes for the G allele was more than doubled in the infected group as compared to the non-infected group. The Poisson regression model was consistent with a dose effect, suggesting that CC patients are more protected than heterozygous patients and that these are more protected than GG patients against HCV infection. Interestingly, the most significant association observed by our study was not with an infection caused by

a pathogen which would explore directly the intrinsic dysregulation of the SCD patient, but rather an infection which is an indirect consequence of the patients special needs.

This finding is somewhat surprising considering the immunosuppressive role of the HLA-G molecule and the context in which it is being analyzed. Considering HCV infection alone, it could be expected that the C allele, which is more frequently associated to the 14bp deletion and is itself associated to a lesser microRNAs binding to the HLA-G mRNA molecule and, consequently, to a higher HLA-G expression, would be associated to an increased risk of infection by HCV. However, our results revealed that instead of being a risk factor for HCV infection, the C allele seems to confer protection against HCV. This finding suggests a protection mechanism that could be associated to an increase on HLA-G expression. This could, at first glance, seem paradoxal, since the immunosuppression mediated by molecules such as HLA-G could, *a priori*, predispose to infections. However, considering SCD as a chronic inflammatory disease, where the frequent vaso-occlusive events and a constant state of hemolytic anemia may easily lead to an altered state of immune homeostasis, the presence of immune regulatory molecules such as HLA-G could favor a better immune behavior against foreign pathogens. Another finding that supports this view is the fact that homozygosity for the C allele was underrepresented in the group with history of respiratory infections. However, if the resistance to HCV infection conferred by the C allele is restricted to the very specific immune context of SCD patients or if it can be extrapolated to other risk groups remains to be elucidated.

Nevertheless, an association between HLA-G polymorphisms and HCV infections has been previously reported <sup>38</sup>. Martinetti *et al.* have observed that the homozygosity for the 14bp deletion (which is associated to higher expression of HLA-G) as well as the presence of an allele which contains this deletion (\*010401) seem to be risk factors for vertical transmission of HCV whereas the \*0105N allele, which contains the 14bp insertion, confers protection. However, in our study, the 14bp genotype did not seem to be related to



susceptibility to HCV infection. A possible explanation for these conflicting results is the distinct contexts of exposure to the HCV virus focused by each study: vertical transmission of HCV implicates an overcoming of the placental barrier before entering the child's organism, while there is no such barrier when acquiring the virus directly through blood transfusions, which was probably the main case in our study. If HLA-G plays a role on the permissiveness of the placenta to the passage of the virus, and we should point out that HLA-G molecule is a major component of the immune system in this environment, this could perfectly explain the observed discrepancies between our data and the above-mentioned study.

Taken together, our results support the role of HLA-G on the susceptibility to infections in SCD patients, especially HCV. Moreover, they constitute an indirect evidence of the role of microRNAs on the regulation of HLA-G expression through their interaction with the region which encompasses the +3142 polymorphism.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank Vânia Hirakata and Sidia Maria Callegari Jacques for their precious contributions on the statistical analysis of this work. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Ministério da Saúde (MCT/ CNPq/ MS-SCTIE-DECIT 26/2006; 409302/2006-6) and CNPq 303238/2005-4.

## REFERENCES

1. Sauntharajah Y VE, Embury SH. . Sickle cell disease. Churchill Livingstone ed. Philadelphia: Elsevier., 2005.
2. Pauling L, Itano HA, et al. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 1949; **110** (2865): 543-8.
3. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 1997; **337** (11): 762-9.
4. Gladwin MT, Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 51-7.
5. Costa RN, Conran N, Albuquerque DM, Soares PH, Saad ST, Costa FF. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematologica* 2005; **90** (7): 977-9.
6. Chies JA, Hutz MH. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003; **36** (1): 71-5.
7. Vargas AE, da Silva MA, Silla L, JA. C. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens* 2005; **66** (6): 683-90.
8. Tamouza R, Neonato MG, Busson M, et al. Infectious complications in sickle cell disease are influenced by HLA class II alleles. *Hum Immunol* 2002; **63** (3): 194-9.
9. Tamouza R, Busson M, Fortier C, et al. HLA-E\*0101 allele in homozygous state favors severe bacterial infections in sickle cell anemia. *Hum Immunol* 2007; **68** (10): 849-53.
10. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, et al. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008; **71** (5): 440-6.

11. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 2008; **29** (3): 125-32.
12. Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2008; **71** (6): 520-9.
13. Baricordi OR, Stignani M, Melchiorri L, Rizzo R. HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; **7** (2): 67-74.
14. LeMaoult J, Rouas-Freiss N, Carosella ED. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun Rev* 2005; **4** (8): 503-9.
15. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008; **72** (4): 335-41.
16. Borghi A, Fogli E, Stignani M, et al. Soluble human leukocyte antigen-G and interleukin-10 levels in plasma of psoriatic patients: preliminary study on a possible correlation between generalized immune status, treatments and disease. *Arch Dermatol Res* 2008; **300** (10): 551-9.
17. Glas J, Torok HP, Tonenchi L, et al. The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *Int Immunol* 2007; **19** (5): 621-6.
18. Veit TD, Cordero EAA, Mucenic T, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009; [in press].
19. Hviid TV, Milman N, Hylenius S, Jakobsen K, Jensen MS, Larsen LG. HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006; **23** (1): 30-7.

20. Park KS, Park JS, Nam JH, Bang D, Sohn S, Lee ES. HLA-E\*0101 and HLA-G\*010101 reduce the risk of Behcet's disease. *Tissue Antigens* 2007; **69** (2): 139-44.
21. Lin A, Yan WH, Xu HH, et al. 14 bp deletion polymorphism in the HLA-G gene is a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in a Chinese Han population. *Tissue Antigens* 2007; **70** (5): 427-31.
22. Gazit E, Slomov Y, Goldberg I, Brenner S, Loewenthal R. HLA-G is associated with pemphigus vulgaris in Jewish patients. *Hum Immunol* 2004; **65** (1): 39-46.
23. Tan Z, Randall G, Fan J, et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 2007; **81** (4): 829-34.
24. Veit TD, Chies JA. Tolerance versus immune response - MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* 2009; **20** (4): 229-31
25. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19** (19): 5444.
26. Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002; **60** (2): 122-32.
27. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004; **1** (1): 6.
28. DeVault KR, Friedman LS, Westerberg S, Martin P, Hosein B, Ballas SK. Hepatitis C in sickle cell anemia. *J Clin Gastroenterol* 1994; **18** (3): 206-9.
29. Hasan MF, Marsh F, Posner G, et al. Chronic hepatitis C in patients with sickle cell disease. *Am J Gastroenterol* 1996; **91** (6): 1204-6.
30. Arruda VR, Eid KA, Zen GC, Goncales NS, Saad ST, Costa FF. Hepatitis C antibody (anti-HCV) prevalence in Brazilian patients with sickle cell diseases. *Vox Sang* 1993; **65** (3): 247.

31. Hassan M, Hasan S, Giday S, et al. Hepatitis C virus in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 2003; **95** (10): 939-42.
32. Hassan M, Hasan S, Castro O, Giday S, Banks A, Smoot D. HCV in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 2003; **95** (9): 864-7, 872-4.
33. Adewuyi JO. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among normal blood donors and multi-transfused sickle-cell anaemia patients in Nigeria. *Trop Doct* 1996; **26** (1): 29-30.
34. Torres MC, Pereira LM, Ximenes RA, et al. Hepatitis C virus infection in a Brazilian population with sickle-cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003; **36** (3): 323-9.
35. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; **38** (1): 41-9.
36. Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 2001; **57** (1): 46-50.
37. Akohoue SA, Shankar S, Milne GL, et al. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res* 2007; **61** (2): 233-8.
38. Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006; **19** (2): 369-78.

**Table 1**

Table 1: Patients features and clinical manifestations

	<i>N (%)</i>	<i>mean</i>	<i>SD</i>
SS (total n = 96)			
Females	45 (48.4)		
Males	48 (51.6)		
Age (years)		27.3	12.2
Age at HU treatment (years)		19.4	11.8
<i>Clinical complications</i>			
Pain crisis	84 (90.3)		
≥1 Blood transfusions <sup>a</sup>	36 (37.5)		
Priapism	10 (20.8) <sup>b</sup>		
HCV infection	21 (22.6)		
Foot ulcers	13 (14.0)		
Bone <sup>c</sup>	21 (22.6)		
Neurological <sup>d</sup>	15 (16.1.)		
Respiratory <sup>e</sup>	48 (51.6)		
Gastroenterological <sup>f</sup>	57 (61.3)		
Circulatory <sup>g</sup>	21 (22.6)		
Endocrinal	2 (2.2)		
Sensorial <sup>h</sup>	6 (6.5)		
Genital-urinary	11 (11.8)		
Lymphatic	6 (6.5)		

<sup>a</sup> During one year follow-up <sup>b</sup> Only male patients (total = 48)

<sup>c</sup> Osteonecrosis/osteomyelitis <sup>d</sup> cerebrovascular accident /mental retardation/epilepsy

<sup>e</sup> upper respiratory tract infections/bronchopneumonia/asthma/rhinitis/sinusitis

<sup>f</sup> gastric ulcer/ cholelithiasis/hepatomegaly/ splenomegaly <sup>g</sup> deep vein thrombosis/ systemic artherial hypertension/pulmonary hypertension/cardiomegaly <sup>h</sup> otitis and retinopathies

**Table 2**

Table 2: HLA-G genotype frequencies

	<i>Patients (%)</i>	<i>Controls (%)</i>	<i>P-value</i> <sup>a</sup>
14 bp			
Ins/ins	15 (16.5)	34 (13.1)	0.378
Ins/del	47 (51.6)	122 (47.1)	
Del/del	29 (31.9)	103 (39.8)	
+3142			
CC	16 (17.2)	47 (18.1)	0.977
CG	47 (50.5)	130 (48.6)	
GG	30 (32.3)	87 (33.2)	

<sup>a</sup> Pearson  $\chi^2$

**Table 3**

Table 3: HLA-G genotype and prevalence of HCV infections

<i>HCV</i>		<i>GG</i>	<i>CG</i>	<i>CC</i>	<i>%<sub>C</sub> allele</i>
Yes	+3142	12 (57.1)	9 (42.9)	0 (0.0)	21.4 <sup>a</sup>
No		18 (25.0)	38 (52.8)	16 (22.2)	48.6 <sup>a</sup>
		<i>del/del</i>	<i>ins/del</i>	<i>ins/ins</i>	<i>%<sub>ins</sub> allele</i>
Yes	14 bp	3 (14.3)	14 (66.7)	4 (19.0)	52.4 <sup>b</sup>
No		27 (37.5)	34 (47.2)	11 (15.3)	38.9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P=0.003 <sup>b</sup>P=0.167



**Table 4**

Table 4: Poisson regression with robust variance model and predicting variables for development of HCV infection (Model significance <0.0001)

<i>Variable</i>	<i>PR</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>	<i>P<sub>corr</sub></i>
HLA-G +3142C	0.41 <sup>a</sup>	0.24-0.71	0.001	0.003
≥1 BT/year	2.60	1.2-6.00	0.015	0.045

PR, Prevalence Ratio; 95% CI, 95% confidence interval; BT, blood transfusions

<sup>a</sup> For each G allele.

**Table 5**

Table 5: +3142 genotype and respiratory tract infections

		GG	CG	CC	%G allele	P <sup>a</sup>	P <sub>corr</sub>
Upper respiratory tract infections	Yes	7 (43.8)	9 (56.2)	0 (0.0)	28.1	0.104	
	No	24 (30.8)	38 (48.7)	16 (20.5)	44.9		
Bronchopneumonia	Yes	13 (36.1)	20 (55.6)	3 (8.3)	36.1	0.138	
	No	18 (31.0)	27 (46.6)	13 (22.4)	45.7		
Respiratory tract infections	Yes	16 (38.1)	23 (54.8)	3 (7.1)	34.5	0.040 <sup>b</sup>	0.12
	No	14 (27.5)	24 (45.1)	13 (25.5)	49.2		

<sup>a</sup> Considering CC as a protection factor, <sup>b</sup> Prevalence Ratio = 0.37 (0.13-1.05)

## INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O objetivo principal do presente estudo foi analisar a correlação de polimorfismos descritos para os genes da IL-10, uma potente interleucina anti-inflamatória e do HLA-G, molécula que funciona como inibidora de células NK e indutora da expressão de IL-10, com a patofisiologia da Anemia Falciforme.

É importante salientar que o presente estudo é parte de um projeto maior que envolve o estudo de outros genes polimórfico como *TNFR11*, *HLA-E*, *MBL2* (molécula envolvida na imunidade inata e ativação de macrófagos), *HO-1* (hemeoxigenase 1), *MMP-2* e *MMP-9* (metaloproteinases de matriz) em pacientes com anemia falciforme.

Em um primeiro momento deste capítulo compararemos os dados relevantes obtidos a partir do levantamento clínico de todos os nossos pacientes com a literatura. Em anexo às considerações finais serão apresentadas metodologias e dados adicionais [**Anexo I: DADOS COMPLEMENTARES**, contemplando o Local de realização, População, Levantamento dos dados clínicos dos pacientes, Coleta de sangue, Análise dos polimorfismos do promotor de IL-10 (extração de DNA, procedimentos de genotipagem, resultados), além da parte da análise da expressão de IL-10 (extração de RNA, Síntese de cDNA, PCR quantitativo e resultados); **Anexo II: PROTOCOLO DE ANEMIA FALCIFORME** para obtenção de dados clínicos e **Anexo III: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**].

Foram estudados 99 indivíduos com Anemia Falciforme que apresentaram grande heterogeneidade clínica. Entre os sintomas apresentados por estes

pacientes, em diferentes fases da doença, encontramos: crises vaso-oclusivas, úlcera de pé, infecção por HCV; no sistema respiratório as infecções de vias aéreas superiores (IVAS), broncopneumonia (BCP), rinitis/sinusite alérgica e asma; no sistema neurológico o acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia; no sistema gástrico a hepatomegalia, esplenomegalia, úlcera gástrica, colelitíase, esplenomegalia; no sistema genito urinário as infecções urinárias e priapismo; no sistema linfático as adenomegalias, no sistema circulatório a cardiomegalia, o tromboembolismo venoso profundo (TVP), flebitis, hipertensão arterial sistêmica (HAS), hipertensão arterial pulmonar (HAP), no sistema ósseo a osteonecrose e osteomielite, e no sistema sensorial as doenças infecciosas de ouvido e retinopatias. Como podemos observar, os pacientes de AF do presente estudo apresentaram ampla diversidade de manifestações clínicas corroborando o que já foi demonstrado em outros trabalhos <sup>30,32,62,68</sup>.

Nossa amostra de pacientes abrangeu diferentes faixas etárias podendo ser agrupados em adultos n=74 (maiores de 19 anos), adolescentes n=18 (> 10 até 19 anos) e crianças n=7 (0 até <10 anos).

Os autores como Naoun em 1997 <sup>42</sup>; Silla em 1999 <sup>43</sup>; Quinn e cols. <sup>28</sup> e Steinberg em 2008 <sup>32</sup> aconselham acompanhamento médico dos pacientes com AF fornecendo aconselhamento familiar, terapia medicamentosa ou transfusional e vacinações; toda nossa população de portadores de AF segue este acompanhamento e possivelmente devido a este fato a expectativa de vida tem aumentado em nossa população de estudo, 27% dos pacientes possuem mais de 40 anos, concordando com os dados obtidos por Platt e cols. (1994) <sup>20</sup>.

Como sabemos a HU afeta a proliferação celular, diminuindo a expressão de moléculas de adesão, aumentando os níveis de HbF e, dessa maneira, os pacientes com AF tem uma melhora no curso clínico da doença<sup>50,131</sup>. De todos os pacientes, 65% tomam regularmente HU, 8% não toma HU seja por adesão baixa ao medicamento ou porque clinicamente não precisam (apresentam altos níveis de HbF), e 27% toma HU de maneira irregular seja porque não tem condições econômicas de comprar a medicação e/ou por falta da medicação no posto de saúde.

Sabemos que ao nascer temos cerca de 60% de HbF e ao passar do tempo esta é quase completamente substituída por outros tipos de Hb, encontrando-se somente 1% da HbF em adultos normais. Um dos moduladores clínicos mais estudados na AF é a HbF. Nos pacientes com AF que tem uma concentração alta de HbF há menor formação de polímeros de HbS, e conseqüentemente uma redução da falcemização das hemácias, redução da VO e uma maior expectativa de vida<sup>7,8,20</sup>. Também foi visto que níveis elevados de HbF estão associados à clínica menos grave da doença<sup>20,51</sup>.

De nosso levantamento do registro hospitalar de todos os 99 pacientes observamos que 44 pacientes apresentavam níveis de HbF superiores a 2% antes do tratamento com HU, 8 apresentavam níveis de HbF inferiores a 2%, e havia ausência desta informação para 47 pacientes. No seguimento destes 99 pacientes (até novembro de 2008) os níveis atuais de HbF após tratamento com HU foi: 58 pacientes tiveram níveis acima de 2%, 2 pacientes tiveram níveis abaixo de 2%, e havia ausência desta informação para 38 pacientes. É interessante salientar que um paciente que não recebeu HU apresentou níveis de HbF superiores a 5%.

Dentre os 58 indivíduos que tomam HU e que possuíam níveis de HbF superiores a 2%, observamos que 15 pacientes apresentaram níveis de HbF superiores a 15%, 30 pacientes apresentaram níveis de HbF superiores a 5% e inferiores a 15%, e 13 pacientes apresentaram níveis de HbF superiores a 2% e inferiores a 5%. Correlacionando os dados dos pacientes que tomam HU e tem HbF alta com os achados clínicos dos mesmos, não houve qualquer associação. Inati e cols. (2003)<sup>33</sup> agruparam pacientes libaneses de acordo com a porcentagem da HbF: maior de 5%, entre 5 e 15%, e maior de 15%; e observaram que os pacientes com HbF alta, maior de 15%, tem maior severidade nas manifestações clínicas. No entanto, cabe notar que os autores mencionados relataram que níveis de HbF são importantes, mas não é somente este parâmetro que afeta a severidade clínica da doença falciforme. Em nosso estudo encontramos que 59% dos pacientes tem níveis elevados de HbF e tomam HU, e 4% tem níveis elevados de HbF e não tomam HU. Esta população de 63 pacientes relata crises álgicas (88%) e apresenta afecções do sistema respiratório e gástrico (41% e 57% respectivamente); sugerindo que os níveis de HbF não são preditores de efeito protetor em nossos pacientes.

A introdução de antibioticoterapia nos pacientes de AF na década de 1980 diminuiu a incidência de infecções bacterianas nestes pacientes, sendo benéfica em crianças a partir dos 4 meses de idade. Desde então o uso da penicilina oral, por exemplo, é associado à diminuição de infecções e a morbidade e mortalidade na AF como foi visto por Quinn e cols. (2004)<sup>28</sup>.

Fazendo um levantamento clínico dos 7 pacientes pediátricos: 72% tiveram crises álgicas, 57% comprometimento ósseo (43% osteonecrose e 14%

osteomelite), 43% fizeram colicistectomia e 29% tiveram BCP e IVAS. Estes dados concordam com os obtidos por Redding-Lallinger & Knoll em 2006<sup>68</sup> e Steinberg em 2007<sup>135</sup>. Steinberg em (2008)<sup>32</sup> enfatizam que o risco de infecções em uma criança menor de 5 anos com AF é 30 vezes maior que em crianças da população geral. Como descrito por Lyra e cols. (2005)<sup>25</sup>, a causa mais comum de hospitalização nos pacientes pediátricos com AF é a vaso-oclusão, seguida das infecções.

Sabendo que nossa amostra pediátrica é pequena, o que mais chama a atenção é ter apenas 1 paciente com AVC, já que pelo descrito na literatura, a maior incidência de AVC se encontra na faixa etária entre 1 e 9 anos<sup>89,91</sup>. Entre os pacientes adolescentes não foi observado AVC e entre os adultos 8 tiveram AVC. Acreditamos que a baixa incidência observada de AVC é resultado de um bom tratamento médico seguindo as recomendações indicadas pela prevenção, seja devido a transfusões, como através de agentes antitrombóticos e HU como recomendado por Steinberg e cols.<sup>129</sup>.

Sabemos que a VO é um dos principais sintomas clínicos da AF, sendo este fenômeno causa de obstrução dos vasos sanguíneos associado à formação de polímeros da HbS, danos à membrana da hemácia e tempo de falcização. Esta obstrução ocorre após interação entre as hemácias, os leucócitos, plaquetas, moléculas de adesão e endotélio vascular, ocorrendo principalmente nas veias pós-capilares. Este fenômeno é amplificado por citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos monócitos, células endoteliais, leucócitos e outras células<sup>5,56</sup>. O fenômeno VO ou eventos subclínicos de VO podem desencadear inflamação

como descrito no estudo de Chies & Nardi <sup>141</sup>, porém não se sabe a sequência destes eventos. Sendo assim, a AF tem uma condição inflamatória crônica e a imunidade individual pode estar diretamente relacionada a ocorrência de infecções.

Como sabemos, os reticulócitos expressam em sua membrana o complexo de integrinas VLA-4 que se liga a VCAM-1 nas células endotélias através do estímulo de citocinas que promovem adesão endotelial <sup>5</sup>. Esta adesão pode provocar hemólise na AF, que ocorre durante o primeiro estágio da crise algica, com o aumento do número de células densas, seguido por reticulocitose <sup>5</sup>. Lamentavelmente, de todo o levantamento clínico de nossos pacientes falcêmicos não obtivemos os dados relativos a incidência de reticulocitose. Outras células muito importantes na clínica da AF são os leucócitos, muitos estudos evidenciam a associação da leucocitose como fator de risco para a ocorrência de AVC <sup>91</sup> e síndrome torácica aguda <sup>80</sup>. O AVC ocorreria após a participação dos leucócitos na VO promovendo o aumento da adesão ao endotélio vascular <sup>91</sup> e são os leucócitos que estimulam a liberação de proteínas citotóxicas e substâncias vaso-ativas, citocinas e quimiocinas as quais promovem a atração de mais leucócitos. De nossos pacientes com AF manifestando crises VOs e infecções 42% apresentaram leucocitose, desta maneira se confirma a importância dos leucócitos na gravidade da AF.



## **ANEXO I**

### **DADOS COMPLEMENTARES**

#### **LOCAL DE REALIZAÇÃO**

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Células Hematopoiéticas e Análise Molecular, no Laboratório de Terapia Gênica, ambos pertencentes ao Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Faculdade de Biociências – PUCRS.

#### **POPULAÇÃO**

Foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos com Anemia Falciforme que estão sob tratamento no ambulatório de Hemoglobinopatias do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do HCPA.

Para a genotipagem dos polimorfismos do promotor de IL-10, o presente estudo contou com uma amostra de 100 indivíduos que receberam atendimento no HCPA e 314 indivíduos de banco de DNA já estabelecido no Laboratório de Imunogenética. No caso das análises referentes ao nível de expressão de IL-10 foram coletadas novas amostras de sangue periférico de 39 pacientes adultos,

com diagnóstico clínico confirmado para Anemia Falciforme, do ambulatório de Hemoglobinopatias do HCPA e amostras de 22 indivíduos adultos normais de doadores do Banco de Sangue do HCPA, controlados por idade, sexo e raça. Das amostras controle se efetuou eletroforese de hemoglobina para comprovar que os indivíduos não possuíam traço falcêmico.

### **LEVANTAMENTO DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES**

Utilizou-se um formulário (Anexo II) aplicado aos pacientes que se disponibilizaram a participar do presente estudo, para a obtenção dos dados clínicos dos pacientes. Simultaneamente, foram acessados os prontuários dos pacientes para que dados específicos pudessem ser obtidos para preencher melhor a tabela a ser usada.

### **COLETA DE SANGUE**

A coleta de sangue periférico dos pacientes que concordaram em participar do estudo foi realizada no Ambulatório de Hemoglobinopatias do HCPA, de acordo com o Termo de Consentimento Informado (Anexo III). Para tanto, foram coletados 5ml de sangue periférico do indivíduo, imediatamente acondicionados em tubo Vacutainer com EDTA (BD Biosciences) e conservados a 4° C até sua manipulação.

### **ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE IL-10**

Foram estudados os polimorfismos nas seguintes posições da sequência promotora do gene de IL-10: posição -1082 que constitui de uma substituição de G

por A, posição -819 uma substituição do C por T e posição -592 que é uma substituição C por A.

### **Extração de DNA**

O DNA foi extraído a partir de amostras de células obtidas de sangue periférico. As extrações de DNA foram feitas de acordo com a técnica descrita por Lahiri e Nurnberger (1991)<sup>202</sup>, estabelecendo-se um banco de DNA de pacientes com Anemia Falciforme.

### **Procedimentos de genotipagem**

Foram amplificadas 95 amostras de indivíduos falcêmicos e 314 amostras controles, utilizando os oligonucleotídeos específicos IL-10:

Direto: 5' ATCCAAGACAACACTACTAA 3'

Reverso: 5' TAAATATCCTCAAAGTTCC 3'

As condições de amplificação foram 10 p moles de cada *primer*, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1x Tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 200ng de DNA em um volume final de 50µl. Para amplificação, as amostras foram submetidas a desnaturação inicial de 1 minuto 94°C, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 3 minutos a 72°C. A amplificação foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Logo se fez a purificação das amostras utilizando as enzimas Exonuclease (*Exo I* - GE Healthcare) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*SAP* - GE Healthcare). Para a reação

de purificação foram utilizados 3,3U de *Exo I*, 0,66U de *SAP* e 6 $\mu$ L do produto do PCR da IL-10 em um volume final de 10  $\mu$ l, sendo mantida por 3 horas a 37°C.

Já com as amostras purificadas se fez a quantificação das amostras no espectrofotometro (NanoDrop 1000 *Thermo Scientific*), e preparou-se a reação para o sequenciamento da seguinte maneira: produto de PCR no máximo 100ng + 0,25  $\mu$ M do *primer* reverso em um volume final de 6 $\mu$ L. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o sequenciador MegaBACE e para a análise das seqüências foi usado o programa Chroma<sup>203</sup>.

## **Resultados**

Até o momento todas as amostras foram amplificadas e purificadas. Destas, 15 amostras já foram seqüenciadas e analisadas.

## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE IL-10**

### **Extração de RNA**

O RNA total foi extraído das células mononucleares do sangue periférico, utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), conforme o protocolo do fabricante.

### **Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Liang e cols. (1993)<sup>204</sup>, utilizando-se 2  $\mu$ g de RNA total, a enzima transcriptase reversa

do vírus murino Moloney (MMLV-RT, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e o oligo-dT:

5' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN 3'

### PCR quantitativo

As análises de RT-PCR em Tempo Real das 39 amostras de pacientes falcêmicos e das 21 amostras de indivíduos controles, foram realizadas em triplicatas. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para IL-10, o gene alvo:

Direto: 5'TCCCTGTGAAAACAAGAGCAA 3'

Reverso: 5'TCGCCACCCTGATGTCTC 3'

e para GAPDH, o gene normalizador:

Direto: 5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'

Reverso: 5' AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG 3'

A reação foi feita utilizando-se o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e 5 pm de cada *primer* e 2 µl de cDNA sintetizado. Para amplificação as amostras foram submetidas a desnaturação inicial de 10 minuto 95°C, seguida por 45 ciclos de 10 segundos a 94°C, 15 segundos a 60°C e 35 segundos a 72°C. Para obter a curva de dissociação, as amostras foram aquecidas a 95°C e resfriadas por 1 minuto e 55°, para anelamento, posteriormente foram aquecidas de 55°C a 95°C com um aumento de 0,5°C a cada 30 segundos. A análise foi realizada com o auxílio do *iQ™5 Optical System Software* (Bio Rad).

## **Resultados**

Até o momento todas as triplicatas das amostras dos pacientes e controles já foram analisadas. Os resultados indicam que não houve diferença significativa quando comparamos pacientes e controles, pacientes que tinham queixas relevantes e sem queixas no dia da coleta, pacientes com diferentes tipos de tratamento e pacientes que recebem HU ou não.

Com tudo isto, ainda falta amadurecer melhor nossos resultados. Em um primeiro momento se pensaria em aumentar o número amostral incluindo pacientes que no dia da coleta apresentem alguma manifestação clínica mais relevante.

## ANEXO II

### PROTOCOLO DE ANEMIA FALCIFORME

#### IDENTIFICAÇÃO:

- 1.Nome do paciente: \_\_\_\_\_  
2.Registro: \_\_\_\_\_ Data inicial: \_\_\_\_\_  
3.Endereço: \_\_\_\_\_  
4.Fone: \_\_\_\_\_

#### DADOS DEMOGRÁFICOS:

- 5.Sexo: ( )M ( )F  
6.Idade: \_\_\_\_\_ anos e \_\_\_\_\_ meses. Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_  
7.Raça: ( )negra ( )branca ( )mulato ( )asiático  
8.Estado civil: ( )casado ( )solteiro ( )viúvo ( )divorciado/separado  
9.Classe sócio-econômica: \_\_\_\_\_

#### HISTÓRIA FAMILIAR:

- 10.Número de anêmicos na família: \_\_\_\_\_  
11.Grau de parentesco: ( )pais ( )irmãos ( )avós ( )filhos ( )tios  
( )primos ( )sobrinhos  
12.Idade do diagnóstico: \_\_\_\_\_ anos e \_\_\_\_\_ meses  
13.Motivo do diagnóstico:  
( )dactilite ( )anemia ( )artralgia ( )dor abdominal ( )AVC  
( )cefaléia ( )dor torácica ( )úlceras Msls ( )IVAS ( )ITGU  
( )ITGI ( )ISNC ( )osteomielite ( )pesquisa familiar  
( )convulsão ( )icterícia ( )esplenomegalia  
( )outros: \_\_\_\_\_

#### HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA:

- 14.Idade da menarca: \_\_\_\_\_ anos

15. Número de gestações: \_\_\_\_\_  
16. Número de abortos: \_\_\_\_\_  
17. Natimortos: \_\_\_\_\_  
18. Filhos vivos: \_\_\_\_\_  
19. Filhos mortos: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA MÓRBIDA PROGRESSIVA:

20. Total de crises álgicas (abdômen, tórax ou óssea): \_\_\_\_\_  
21. Total de infecções: \_\_\_\_\_  
22. Total de transfusões: \_\_\_\_\_  
23. Total de internações: \_\_\_\_\_  
24. Úlcera em Msls: ( )sim ( )não  
25. Osteomielite: ( )sim ( )não  
26. Pneumonia: ( )sim ( )não  
27. AVC: ( )sim ( )não  
28. TVP: ( )sim ( )não  
29. Dor crônica: ( )sim ( )não  
30. Colelitíase: ( )sim ( )não  
31. Evolução da colelitíase: ( )assintomática ( )infecção ( )cirurgia  
( )litíase biliar  
32. Retinopatia: ( )sim ( )não  
33. Hipostenúria: ( )sim ( )não  
34. Seqüestro esplênico: ( )sim ( )não  
35. Priapismo: ( )sim ( )não  
36. Necrose asséptica: ( )sim ( )não  
37. Trombocitose: ( )sim ( )não  
38. Leucocitose: ( )sim ( )não

EXAMES COMPLEMENTARES:

a. Ecografia abdominal

39. Hepatomegalia: ( )sim ( )não  
40. Esplenomegalia: ( )sim ( )não  
41. Baço atrófico: ( )sim ( )não  
42. Esplenectomia: ( )sim ( )não



Ecocardiografia

43. ( ) normal ( ) valvulopatia ( ) insuficiência cardíaca  
( ) cardiomegalia ( ) cardiopatia isquêmica
44. Fração de ejeção: \_\_\_\_\_%

b. Eletrocardiograma

45. \_\_\_\_\_

c. Exames laboratoriais séricos

46. Ferritina: \_\_\_\_\_
47. Saturação de transferrina: \_\_\_\_\_%
48. Vitamina B12: \_\_\_\_\_
49. Folato: \_\_\_\_\_
50. Glicemia: \_\_\_\_\_ mg/dl
51. Deficiência de G6PD: ( ) sim ( ) não

d. Exames laboratoriais hematológicos

52. Hematócrito: \_\_\_\_\_
53. Hemoglobina: \_\_\_\_\_
54. VCM: \_\_\_\_\_
55. CHCM: \_\_\_\_\_
56. RDW: \_\_\_\_\_
57. Reticulócitos: \_\_\_\_\_
58. Plaquetas: \_\_\_\_\_
59. Leucócitos: \_\_\_\_\_
60. Eletroforese de hemoglobinas: HbA<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ HbA \_\_\_\_\_ HbS \_\_\_\_\_ HbC \_\_\_\_\_  
Hb Fetal \_\_\_\_\_

Data de início da Hidroxiuréia (HU): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

61. HbF no início do tratamento com HU: \_\_\_\_\_
62. Ht no início do tratamento com HU: \_\_\_\_\_
63. Hb no início do tratamento com HU: \_\_\_\_\_
64. Dose inicial: \_\_\_\_\_ mg
65. Última data de uso da HU: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

66.HbF na última data de uso:\_\_\_\_\_

67.Ht na última data de uso:\_\_\_\_\_

68.Hb na última data de uso:\_\_\_\_\_

## **ANEXO III**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Avaliação imunogenética de pacientes com anemia falciforme, contemplado pelo edital MCT/ CNPq/ MS-SCTIE-DECIT 26/2006, é um agregado dos projetos relacionados abaixo:

01282: Avaliação da atividade funcional das células “Natural Killer” em indivíduos normais e em indivíduos com anemia falciforme.

01250: Anemia falciforme – determinação da capacidade imunológica de indivíduos afetados ou com traço falcêmico.

02438: Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme.

#### **POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**

A anemia falciforme é determinada por uma alteração genética que provoca a deformação das células sanguíneas dos pacientes. O quadro clínico apresentado por estas pessoas é influenciado por fatores do ambiente no qual o indivíduo se encontra e também por fatores genéticos.

Este estudo está sendo realizado para tentar identificar fatores genéticos que interferem com o desenvolvimento da anemia falciforme.

#### **DE QUE CONSTA O ESTUDO?**

Será coletada uma amostra de sangue. Desta amostra, será extraído DNA, o qual será utilizado para a análise de polimorfismos de genes que possam estar associados ao quadro clínico observado nesta doença; análise da expressão da proteína IL-10 e atividade de células NK. O uso do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

#### **QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTES ESTUDOS?**

- Como o presente trabalho visa identificar mecanismos genéticos envolvidos na anemia falciforme, poderá identificar novos alvos para a utilização de medicamentos para o tratamento desta doença;
- Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço do conhecimento sobre a anemia falciforme, e mais especificamente contribuindo para o desenvolvimento futuro de tratamentos mais específicos e menos agressivos.

### **QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?**

Comparecer ao hospital;

Realizar uma coleta de sangue, que pode causar dor temporária e/ou um hematoma.

### **HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?**

Este estudo foi planejado para encerrar em 2008. No entanto, é possível que outros fatores relacionados ao quadro clínico da anemia falciforme possam vir a ser analisados mais adiante.

### **DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE:**

- B. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- C. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- D. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- E. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

## COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um X apenas 1 das opções abaixo:

( ) Autorizo o uso do material coletado para esta pesquisa.

( ) Autorizo uso e estoque do material coletado para esta pesquisa e para a análise de outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do responsável legal: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou do responsável legal: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Pesquisador Responsável no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Dra. Lúcia Silla  
Pesquisadores Responsáveis no Departamento de Genética da UFRGS: Prof.  
José Artur Bogo Chies

Telefone para contato: (51) 3308-6740 (Prof. José Artur Bogo Chies)

## PERSPECTIVAS

- Aumentar o banco de DNA dos pacientes falcêmicos,
- Concluir o sequenciamento das amostras falcêmicas e controles para poder fazer as análises estatísticas,
- Em relação ao PCR quantitativo: coletar amostras de pacientes que estejam fazendo alguma “crise”, para assim poder comparar com pacientes clinicamente estáveis; aumentar o número amostral de pacientes