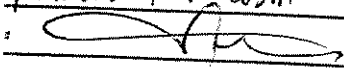


Universidade Estadual de Campinas



Raimundo N P Costa

**“Polimorfismos dos Genes *PSGL-1*, *ICAM1*, *CD18*,
Mieloperoxidase e Manifestações Clínicas na
Anemia Falciforme”.**

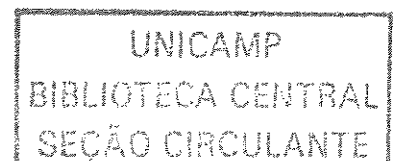
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RAIMUNDO N. P. COSTA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética
Médica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Campinas

2004



UNIDADE	730
Nº CHAMADA	F/UNICAMP
	C823p
V	EX
TOMBO BC/	62984
PROC.	16P00086.05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	13/04/05
Nº CPD	

RIBID - 345894

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C823p **Costa, Raimundo Nonato Pereira da**
Polimorfismo dos genes Psgl-1, ICAM-1, CDI 8, mieloperoxidase e manifestações clínicas na anemia Falciforme / Raimundo Nonato Pereira da Costa. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

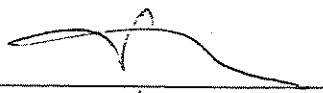
Orientador: Fernando Ferreira Costa
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Acidentes vasculares cerebrais. 2. Adesão celular. 3. Hemoglobina.
I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

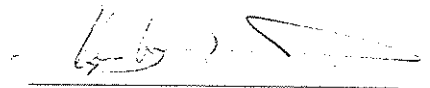
Campinas, 24 de março de 2004.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa (orientador)



Profa. Dra. Christine Hackel



Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo



Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Galandro



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	vii
Introdução.....	01
Objetivos.....	11
Métodos.....	13
Resultados.....	20
Discussão e Conclusões.....	33
Anexos.....	38
Referências.....	49

FIGURAS E TABELAS

- Figura 1: Mostra ampliada das moléculas de adesão nos leucócitos e seus contrareceptores no endotélio (adaptado de Robbins, Pathologic Basic Diseases).
- Figura 2: O sistema H_2O_2 -MPO-haleta e geração de HOCl.
- Figura 3: Padrão de migração em gel de acrilamida a 7% do produto de PCR da região do VNTR do gene *PSGL-1*.
- Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2% dos fragmentos digerido com a enzima *MBO II* do PCR da região do polimorfismo C1323T (V441) do gene *CD18*.
- Figura 5: CSGE em gel de acrilamida a 10% do PCR da região do polimorfismo G241R do gene *ICAM-1*.
- Figura 6: CSGE em gel de arilamida a 10% do PCR da região do polimorfismo E469K do gene *ICAM-1*.
- Figura 7: CSGE em gel de acrilamida a 10% do PCR da região do polimorfismo G-463A do gene *ICAM-1*.
- Figura 8: Mostra esquemática dos alelos A, B e C da proteína codificada pelo gene *PSGL-1*.
- Tabela 1: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo no VNTR do gene *PSGL-1* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem AVC.
- Tabela 2: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo no VNTR do gene *PSGL-1* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem FVO.
- Tabela 3: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo C1323T (V441V) do gene *CD18* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem AVC.

- Tabela 4: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo C1323 (V441V) do gene *CD18* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem FVO.
- Tabela 5: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo G657A (G241R) do gene *ICAM-1* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem AVC.
- Tabela 6: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo G657A (G241R) do gene *ICAM-1* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem FVO.
- Tabela 7: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo G1548A (E469K) do gene *ICAM-1* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem AVC.
- Tabela 8: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo G1548A (E469K) do gene *ICAM-1* em controles e em pacientes portadores de AF com e sem FVO.
- Tabela 9: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo G-463A do gene *MPO* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem infecções.
- Tabela 10: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo G-463A do gene *MPO* em controles e em pacientes portadores de AF com ≥ 1 infecções, ≥ 2 infecções ou sem infecções no período de 1996-1999.

Lista de Abreviaturas

<i>AF</i>	Anemia Falciforme.
<i>MPO</i>	Mieloperoxidase.
<i>PSGL-1</i>	P-selectina glicoproteína ligante I
<i>ICAM-1</i>	Molécula de adesão intercelular I
<i>CD18</i>	Molécula de Adesão de Célula de Leucócito. Beta 2 subunidade (ITG β_2).
<i>LFA-1</i>	Antígeno de Função Leucocitária tipo 1. Integrina CD18/CD11A.
<i>Mac-1</i>	Receptor de Complemento tipo 3. Integrina CD18/CD11B.
<i>SNP</i>	Single Nucleotide Polymorphism.
<i>TAC</i>	Tempo de Acompanhamento.
<i>PHHF</i>	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal.
<i>FVO</i>	Fenômenos vaso oclusivos.
<i>STA</i>	Síndrome Torácica Aguda.
<i>NACF</i>	Necrose Asséptica de Color de Fêmur.
<i>UMI</i>	Úlcera de Membros Inferiores.
<i>CSGE</i>	Conformation Sensitive Gel Eletrophoresis.
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction.
<i>RMN</i>	Ressonância Magnética Nuclear.
<i>AVC</i>	Acidente Vascular Cerebral.
<i>CAR/SEN/BEN/BAN/ATP</i>	Haplótipos Camarão/Senegal/Benin/Bantun/Atípico

I. RESUMO

Anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica, mas com uma apresentação clínica variável, devido a possível associação com outros genes. Especula-se que nesta doença genes envolvidos com a resposta inflamatória tenham efeito epistático. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima com atividade antimicrobica, sendo encontrada nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos. O polimorfismo A-463MPO diminui a expressão desta enzima, podendo este alelo ser possível marcador para eventos infecciosos em pacientes com defesa imune já comprometida. Neste estudo 97 pacientes com AF acompanhado pelo ambulatório de hematologia-Unicamp foram inicialmente divididos em dois grupos, conforme o número de internamentos hospitalares para antibioticoterapia: pacientes que não apresentaram infecção com necessidade de internação (64 pacientes) e um segundo grupo onde ocorreu pelo menos 1 episódio de hospitalização devido a infecção (33 pacientes). O grupo controle foi composto por 48 indivíduos sadios negros da Bahia-Brasil. Pacientes e controles foram genotipados para o polimorfismo G/A-463MPO, através da técnica de “Conformation Sensitive Gel Electrophoresis” (CSGE) e sequenciamento automatizado. Observou-se que a presença do genótipo AA ou AG está associado a maior número de eventos infecciosos ($P=0.005$ OR=3.8). Esta correlação também foi observada na análise quanto à presença do alelo A-463MPO ($P=0.004$ OR=2.7). Este achado sugere que deficiência de MPO em pacientes com AF provavelmente favorece a ocorrência de eventos infecciosos.

Vaso oclusão é o principal evento nas crises dolorosas dos pacientes com anemia falciforme (AF) e marcadores genéticos de risco para eventos vaso oclusivos ainda são desconhecidos. Polimorfismos em genes envolvidos na adesão celular *PSGL-1* (VNTR no exon 2), *ICAM-1* G241R e K461E) e *CD18* (V441V) foram genotipados em 103 pacientes com AF. Os pacientes foram inicialmente divididos em dois grupos: pacientes em que ocorre acidente vascular cerebral (AF+AVC, 16 pacientes) e pacientes sem ocorrência de

AVC (AF-AVC, 87 pacientes). Posteriormente, os pacientes foram divididos em outros dois grupos: pacientes em que foi detectado um dos seguintes eventos: AVC, síndrome torácica aguda (STA), necrose asséptica de cólo de fêmur (NACF) e priapismo (AF+FVO, 35 pacientes) e pacientes em que não ocorrem essas complicações (AF-FVO, 70 pacientes). PSGL-1 é um receptor nas células mielóides e linfócitos T estimulados de alta afinidade para P-selectinas, tendo fundamental papel na adesão dos leucócitos às plaquetas e ao endotélio. O gene contém 3 variantes alélicas (A, B, C) de um número varável de repetição “in tandem” (VNTR). A análise das freqüências dos genótipos e alelos revelou associação da variante B com o grupo AF+FVO [P=0.04, IC 95% OR=2 (1-4)] e quase significativa com os casos de AVC [P=0.09, IC 95% OR=2 (0.8-4.9)], enquanto que o alelo A revelou nível significativo de associação com o grupo AF+FVO [P=0.01 IC 95% OR=0.5 (0.2-0.9)].

O gene da molécula de adesão leucocitário CD-18 é a beta-2 subunidade das integrinas $\alpha\beta$ heterodímeros. O polimorfismo C1323T foi recentemente implicado como fator de risco para fenômenos vaso oclusivos. O estudo deste polimorfismo em pacientes portadores de anemia falciforme não revelou associação significativa com FVO ou AVC.

ICAM-1 é uma molécula da superfamília das imunoglobulinas com importante papel na adesão das células endotelial-leucócitos durante a resposta inflamatória. No mínimo dois sítios polimórficos são conhecidos R241E e K469E. Ambos sítios estão envolvidos na ligação aos contrareceptores Mac-1 e LFA-1. A análise destes polimorfismos através da técnica de CSGE e seqüenciamento, revelou uma associação significativa do heterozigoto K469E para risco a AVC [P=0.02 IC 95% OR=3.6 (1.1-12.3)]. No entanto, o estudo falhou em demonstrar associação alélica com os casos de AVC ou FVO. Como não se conhece

bem a relação funcional deste polimorfismo, maiores estudos são necessários incluindo análise funcional, para se esclarecer o real papel deste polimorfismo ao risco a AVC.

II. INTRODUÇÃO

A AF é uma doença monogênica provocada por uma mutação no 6º códon do gene - globina, representada pela substituição GAG→GTC, que resulta na troca do resíduo glutamyl por valil (^{6 glu val}). Esta substituição ocorre na superfície da molécula, sem provocar alterações significativas na sua conformação global. A hemoglobina S na conformação oxi é estruturalmente similar a normal. A diferença básica entre as duas hemoglobinas HbS e HbA é que quando em soluções concentradas a hemoglobina S tem uma solubilidade muito menor que a desoxihemoglobina A, e esta propriedade é responsável pelo fenômeno da agregação. A hemoglobina (HbS), quando desoxigenada sob condições próximas às fisiológicas, torna-se relativamente insolúvel e agrega-se em longas cadeias poliméricas unidas por ligações não covalentes. Somente a forma desoxigenada da hemoglobina S sofre polimerização. Estes complexos levam a lesão na membrana plasmática, desidratação celular via ativação de canais de cotransporte K⁺:Cl e canais de Gardos, acarretando perda de potássio celular. Assim, essas hemácias sofrem falcização (células em forma de foice) resultando na alteração de sua forma e na redução de sua capacidade de deformação. Como consequência final estas alterações provocam: anemia hemolítica crônica, vaso-oclusão de vasos sanguíneos levando a isquemia e infarto. O fenômeno de falcização pode ser reversível após reoxigenação. Contudo, a repetição desse fenômeno pode causar lesões de membrana fazendo com que a rigidez e a estrutura em foice persistam mesmo após a reoxigenação. As células irreversivelmente falcizadas, em virtude de sua acentuada rigidez, tem diminuída vida média contribuindo para a anemia hemolítica dos pacientes eritrofalcêmicos. A hemoglobina fetal (HbF) inibe a polimerização e esta é a causa da redução dos sintomas nos pacientes com elevados níveis de HbF. A HbA participa pouco do processo de polimerização, sendo a razão para a

ausência de anormalidades clínicas nos heterozigotos AS. O quadro clínico da AF é diferente das demais formas de anemias hemolíticas por não apresentar manifestações clínicas predominantemente secundárias a anemia, mas sim como decorrência de lesões isquêmicas provocadas pela oclusão vascular.

O termo síndrome falciforme identifica as condições em que o eritrócito sofre falcização após redução na pressão parcial de oxigênio, enquanto ao termo doença falciforme é reservada às situações em que a falcização das hemácias conduz a manifestações clínicas. Isquemia, dor, necrose e disfunções, bem como danos permanentes aos tecidos e órgãos, são observadas nas seguintes situações; anemia falciforme que é o estado homozigoto para a hemoglobinopatia S, HbS- β Talassemia, HbSC, HbSD e HbS-persistência hereditária de HbF (S/PHHF). O portador assintomático de falciforme tem patrimônio genético representado pela hemoglobina normal (HbA) associada à hemoglobina S (HbS) e denominado por HbAS, sendo também conhecido por portador do traço de HbS ou heterozigoto para HbS. Os portadores do traço falciformes, não apresentam anormalidades hematológicas e somente em condições especiais podem ter manifestações clínicas.

A frequência de entre portadores heterozigotos HbAS no Brasil é variável de 2 a 8%, conforme a proporção de descendentes africanos existentes nas diferentes regiões[1]. Na população de São Paulo esta frequência estar em torno de 1%. Em Minas Gerais, onde é realizado o maior programa de triagem neonatal do país, o estudo com 260.000 crianças mostrou um caso de doença falciforme para cada 1591 nascimentos[2]. A expectativa de vida nos pacientes com AF é diminuída. Estudo em população da América do Norte revelou uma expectativa de vida de 42 anos para homens e 48 anos para as mulheres[3]. As

mortes tiveram como causas principais a falência de múltiplos órgãos (renal cardíaca, complicações de seqüela crônica de AVC), infecções e hemorragias agudas.

Manifestações Clínicas

Crises Vaso-oclusivas

A AF é caracterizada genericamente do ponto de vista clínico por recorrentes episódios de fenômenos vasos-oclusivos em múltiplos órgãos e em menor grau pela anemia crônica. A oclusão vascular, em geral, ocorre na microcirculação de qualquer órgão, também podendo afetar grandes vasos principalmente em pulmões e no cérebro. Os fatores desencadeantes são variáveis e incluem infecção e desidratação. As crises dolorosas são mais frequentes na terceira e quarta décadas da vida, e a taxa de mortalidade é mais alta em adultos que apresentam maior frequência dessas crises. As crises dolorosas são muito variáveis entre os pacientes com AF. A análise de um grande grupo de pacientes adultos mostrou que aproximadamente um terço apresentava manifestações discretas da doença, um terço mostrava várias manifestações com gravidade intermediária (2-6 internações por ano) e o grupo restante apresentava doença grave (mais de 6 internamentos por ano)[4]. O National Cooperative Study of Sickle Cell Disease dos EUA demonstrou que 40 % dos pacientes com AF não apresentaram episódios de crise dolorosa no período de 5 anos de acompanhamento, enquanto um pequeno grupo apresentou recorrentes episódios de crises de dor.

Complicações Neurológicas

Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes com AF, com incidência maior na população abaixo dos 20 anos. Pode atingir cerca de 6% a 17% dos pacientes com AF e a recorrência pode chegar a 80%

nos 3 anos após o primeiro evento, se nenhuma terapia for instituída[5-7]. Sua patogênese não é clara, mas pressupõe que forças de cisalhamento, em adição a estímulos bioquímicos alterem a função endotelial. Cerca de 17% das crianças com AF podem apresentar alterações na imagem por ressonância magnética (RMN) do cérebro, sugestivas de infarto ou isquemia na ausência de história ou manifestações clínicas de lesão tissular. Esses pacientes são classificados como portadores de infarto silencioso, e demonstram em testes neuropsicológicos desempenho significativamente menor quando comparados a pacientes AF sem anormalidades na RMN[8, 9].

Dentre os fatores associados com maior risco de ocorrência a AVC em pacientes com AF podemos listar: AVC prévio, episódio recente de síndrome torácica aguda, leucocitose, baixa de hemoglobina[10], infecção pelo *Parvovirus humano* B19[11] e hipertensão. Outro grupo de fatores descritos como possivelmente associados a ocorrência de AVC incluem, elevada homocisteinemia, variantes genéticas do angiotensinogênio (repetidos GT, alelos A3 e A4)[7] e indução das atividades das proteínas C e S.

Infecções

Ao lado dos fenômenos vasos-oclusivos, susceptibilidade a infecções é a principal causa de morbidade e mortalidade na AF. Esta predisposição a infecções é multifatorial e não totalmente elucidada. São descritos como fatores predisponentes a hipofunção esplênica devido a autoesplenectomia, defeito na via alternativa do complemento que prejudicaria o processo de opsonização, deficiência de tuftsin, alteração na atividade da hexose-monofosfato dos leucócitos e defeitos na imunidade. Infecções bacterianas representam provavelmente a maior causa de morte na AF, com risco maior em crianças abaixo dos 4 anos de idade. As infecções mais frequentes incluem pneumonias, osteomielite, meningite, infecções do trato urinário e septicemias. As bactérias mais envolvidas são aquelas que

possuem envoltório de polissacarídeos como: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Krebsiella sp*, *Mycoplasma sp* e *Staphylococcus aureus*.

Moduladores De Gravidade na Doença Falciforme

Apesar de se ser doença monogênica, a AF pode apresentar diferentes evoluções clínicas. O mais importante modulador fenotípico é representado pelo HbF. Pacientes com AF e níveis elevados de HbF tem evolução clínica de menor gravidade do que aqueles com níveis menores. Muitos polimorfismos simples de nucleotídeos foram descritos em sítios localizados no cluster globina[12]. Os conjuntos de polimorfismos no *locus* da beta globina agrupados de maneira não ao acaso definem os haplótipos, característicos do gene da hemoglobina S, definidas como os tipos Bantu, Benin, Senegal, Arabe-Indiano e Camarões[13-15]. Esta denominação é derivada da alta prevalência de determinados haplótipos nestes grupos populacionais específicos. Os dados obtidos pela análise dos haplótipos indicaram que a mutação β^s provavelmente apareceu de modo independente nestes 5 grupos[14]. Os mais comuns na população brasileira são o tipo Bantu e Benin. Alguns estudos procuram relacionar o haplótipo e o comportamento clínico da AF. A maior parte dos dados mostra maior nível de HbF nos pacientes com haplótipo Senegal[16-21], o que poderia conferir a este grupo uma evolução clínica benigna. Estes dados porém não se refletem em todos os haplótipos. Assim, muitos pacientes portadores da AF apresentam evolução clínica variada apesar deles possuírem o mesmo haplótipo. Possivelmente, outros fatores atuam na determinação do fenótipo da AF. A maioria dos determinantes que parecem influenciar o curso da doença falciforme afeta a produção de HbF, pois esta inibe a

polimerização da HbS, constituindo assim um importante modulador desta doença. E qualquer elevação dos níveis de HbF age beneficemente sobre a doença.

Outro modulador dos níveis de HbF investigado está relacionado ao gênero, pois existem dados que mostram maior concentração de HbF em mulheres normais e portadoras de AF do que em homens[22, 23]. Isso sugere que exista algum fator ligado ao cromossomo X que age na regulação dos genes da globina[24, 25]. A proteína GF-1, que se liga ao locus Xp21-11, parece está relacionada a expressão de HbF em mulheres[26]. Outra região implicada é ligada ao cromossomo 6q22.3-23.2[27].

Associação entre AF e alfa-talassemia é comum. Na população negra o tipo mais frequente da alfa talassemia ocorre por deleção de um dos genes da globina alfa. Os pacientes com AF e concomitante alfa talassemia heterozigótica tem menor VCM (volume corpuscular médio), maior concentração de hemoglobina, menor número de reticulócitos e menor grau de hemólise. Esta associação não tem efeitos sobre os níveis de HbF nos pacientes portadores de AF e os eventos vaso-oclusivos aparentemente não apresentam frequência reduzida nesses pacientes. Estes pacientes aparentemente apresentam maior número de episódios de dor óssea e menor frequência de úlcera de membros inferiores, AVC e doença vascular da retina

Papel dos Genes de Adesão Celular

Genes envolvidos na aderência do neutrófilo ao endotélio são potenciais genes com efeitos epistáticos, isto é, genes que interferem com a evolução clínica da doença. Os fenômenos vaso-oclusivos são provavelmente multifatoriais. Alterações da função de vários genes tem sido associados com aumento de risco para fenômenos vaso-oclusivos (FVO)[28]. Genes candidatos a participarem de algum modo no fenômeno da vaso-oclusão incluem aqueles que expressam (1) proteínas de aderência (fator de von Willebrand (vWF), laminina, etc),

(2) receptores nas hemácias (CD36, 4 1), (3) Integrinas do endotélio, (4) Moléculas vasoativas (5) Mediadores da função endotelial.

Adesão e transmigração de leucócitos são eventos da resposta inflamatória determinadas por moléculas de adesão expressas em células do endotélio, plaquetas e leucócitos. Estas moléculas pertencem a quatro famílias: as Selectinas, as Imunoglobulinas, as Integrinas e as glicoproteínas “mucin-like”. A glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1), expressada em células mielóides e linfócitos T estimulados, é um contra receptor de alta afinidade para P-selectina no endotélio e plaquetas ativadas, tendo papel fundamental no aprisionamento destas células durante a resposta infamatória na infecção e reparo vascular. A fração extracelular é polimórfica contendo um número variável de repetições em cadeia (VNTR) compreendendo 10 aminoácidos[29]. Três alelos estão identificados e são denominados A, B e C. O Alelo A apresenta todos os 16 decâmeros, o B tem perda do 2º decâmero e o C o 9º e 10º decâmeros[30]. Esses polimorfismos afetam a extensão da porção extracelular da molécula, influenciando a adesão de seus ligantes ao seu sítio ativo[31]. Assim, é admissível que a afinidade ligante de PSGL-1 a P-selectinas possa ser relacionado ao tipo de VNTR existente na molécula. Este fato foi demonstrado em estudos funcionais que revelaram maior adesividade do alelo A em estudos de suscetibilidade a fenômenos trombóticos[32].

As integrinas são moléculas alfa-beta heterodímero. Entre as integrinas a CD18 é a beta-2 subunidade que compõe LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) e p150 (CD11c/CD18). ICAM-1 é uma imunoglobulina que interage com as integrinas presentes sobre os leucócitos. LFA-1 e Mac-1 são as principais integrinas para o receptor ICAM-1 no endotélio(Fig.1). O polimorfismo C1323T no exon 10 do gene *CD18* está provavelmente associado com risco de oclusão vascular em estudo em doença isquêmica cardíaca[33, 34].

Dois polimorfismos em região codificante foram identificados no gene *ICAM-1* e relacionados com complicações em doenças inflamatórias vasculares [códon 4 (G241R) e códon 6 (K469E)][35].

Mediadores Inflamatórios: Papel da Mieloperoxidase na Inflamação.

Fagocitose e destruição de agentes estranhos nos neutrófilos é acompanhada por processo dependente de formas ativas de oxigênio. Deste processo participa a NADPH oxidase que reduz oxigênio a superóxido e que por sua vez é espontaneamente convertido em H_2O_2 (Fig.2). A quantidade de H_2O_2 produzida por este sistema é insuficiente para induzir efetiva morte das bactérias. A MPO é uma hemoproteína localizada nos grânulos azurofílicos dos monócitos e leucócitos polimorfonucleares. Esta proteína na presença de haletos, tais como Cl^- , converte H_2O_2 para HOCl, que é um potente agente microbicida[36]. Este é o sistema mais eficiente que age na morte de bactérias em neutrófilos. Leucócitos deficientes em MPO ainda são capazes de destruir as bactérias, porém mais lentamente do que os leucócitos normais. Este gene tem um polimorfismo na região promotora (G-463A)[37] que reduz marcadamente sua transcrição (alelo A)[38]. Também foi demonstrado que há um aumento de incidência de infecções bacterianas após transplante nos pacientes com genótipo A/G ou A/A[39]. Assim, é admissível supor que predisposição a infecção em paciente com AF esteja associada com baixa atividade da MPO.

Apesar do conhecimento de muitos fatores genéticos moduladores de gravidade na AF como níveis de HbF, presença do gene alfa talassemia, haplótipos do gene globina, ainda não pode ser previsto adequadamente o comportamento clínico da doença. Existem fatores não relacionados ao gene beta globina que influenciam a evolução clínica da AF. A melhor compreensão dos efeitos da atuação desses fatores na fisiopatologia da AF poderá contribuir significativamente para uma melhor abordagem terapêutica nessa doença. O

presente estudo analisa o possível papel dos polimorfismos nos genes *PSGL-1* (VNTR), *CD18* (C1323T) e *ICAM-1* (G241R, K469E) na frequência dos fenômenos vaso oclusivos e *MPO* (-463) nos eventos infecciosos em paciente com AF.

Fig. 1: Mediadores Processo de Adesão dos Leucócitos ao Endotélio.

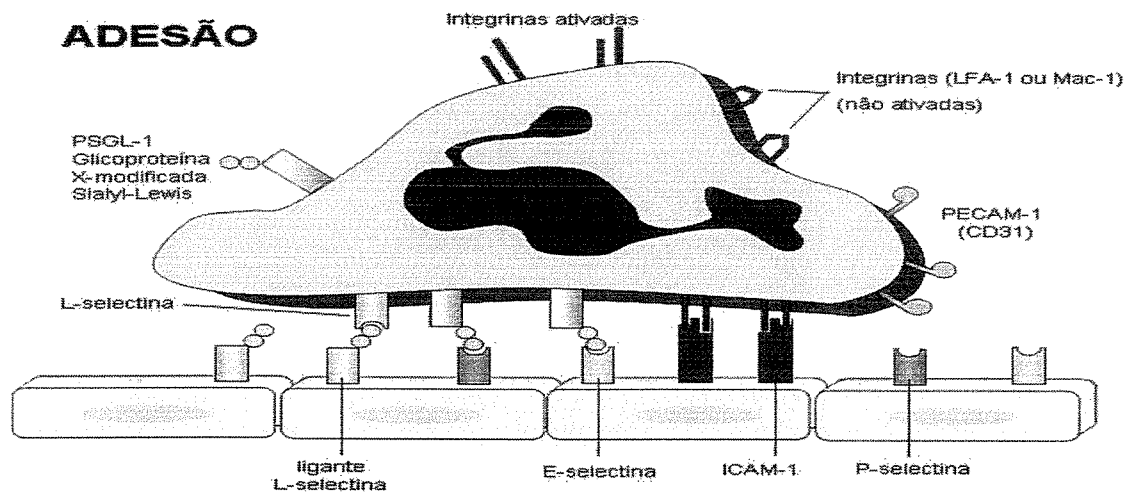
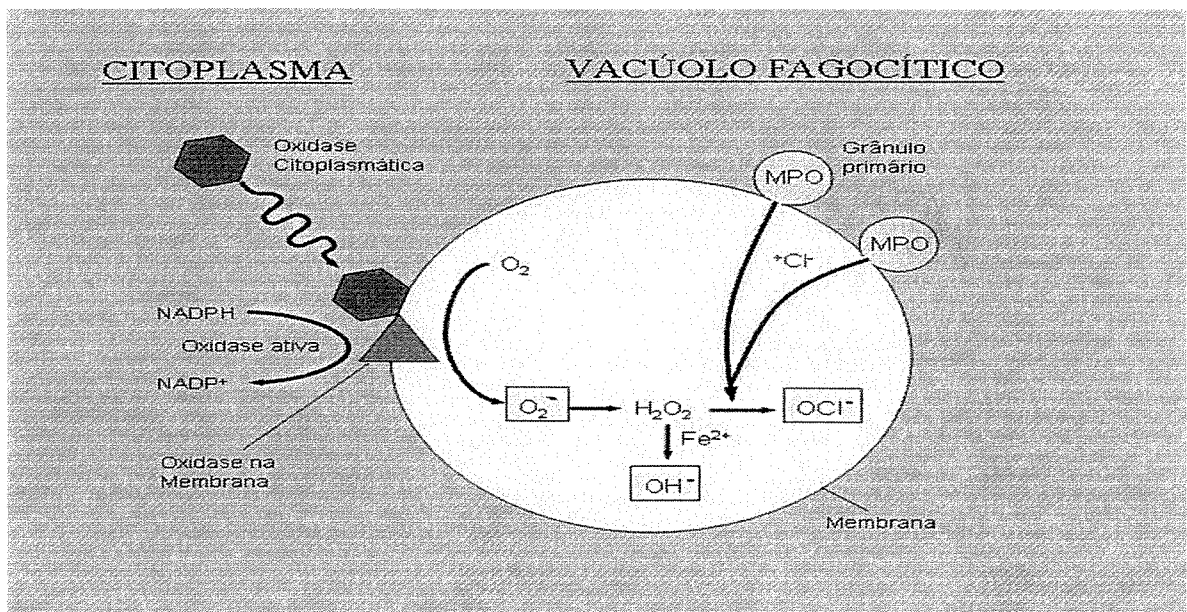


Fig.2: Mecanismo antimicrobicida oxigênio dependente que ocorre dentro do vacúolo fagocítico. Sistema H_2O_2 -MPO-Haleta e atividade da MPO na geração de $HOCl$.



III. OBJETIVOS

Analisar a possível associação entre os polimorfismos dos genes *ICAM-1* (G241R e K469E), *CD18* (V441V), *PSGL-1* (VNTR exon 2) e *MPO* (A-463G) e manifestações clínicas e laboratoriais em pacientes com anemia falciforme.

IV. MÉTODOS

Pacientes

Um total de 103 pacientes com AF, acompanhados pelo ambulatório de Hematologia do HC-Unicamp (89 pacientes), HC-USP (10 pacientes) e Unifesp (6 pacientes), constituído por 56 mulheres, idade média de 26.2 (6-51) anos e 47 homens com idade média de 26.7 (7-52) anos foram estudados. Níveis de Hb, HbF, sexo, idade, tempo de acompanhamento, haplótipo, alfa talassemia e complicações clínicas (AVC, STA, UMI, priapismo e NACF) foram anotados (Anexos 1 e 2).

O diagnóstico de AF foi realizado com base em estudos clínicos e laboratoriais, incluindo eletroforese de hemoglobina e dosagem de HbA₂ e HbF. Adicionalmente o diagnóstico foi confirmado pela análise molecular da mutação β^S , através de sequenciamento automatizado da região do 1ºexon do gene beta globina.

Os fenômenos vaso oclusivos (FVO) foram caracterizados da seguinte maneira:

1. Acidente Vascular Cerebral (AVC): o diagnóstico foi feito por dados clínicos característicos e tomografia computadorizada ou ressonância magnética.
2. Necrose Asséptica de Cabeça de Fêmur (NACV): a identificação desta condição foi feita por exame radiológico.
3. Síndrome Torácica Aguda (STA): o diagnóstico baseou-se em achados radiológicos de amplo infiltrado pulmonar e rápida deterioração da gasometria arterial e rápido curso clínico.
4. Úlcera Membros Inferiores: detecção no exame físico
5. Priapismo: observação e descrição clínica pelo médico assistente no Hospital Universitário.

Para o estudo do polimorfismo A-463G MPO participaram 97 pacientes dos quais, 33 apresentaram infecção que necessitaram internação hospitalar para antibioticoterapia por pelo menos 7 dias. Neste trabalho foram considerados episódios infecciosos casos em que houve febre de origem não identificada e em que houve melhora clínica por pelo menos 7 dias após antibioticoterapia. As infecções mais frequentes foram pneumonia, úlcera infectada, choque séptico, osteomielite, pielonefrite, colecistite (Anexo 3). O grupo controle foi formado por 48 indivíduos saudáveis da população negra da Bahia-Brasil.

Extração DNA

O DNA foi extraído de leucócitos presentes no sangue periférico. Uma alíquota de sangue foi então centrifugada por 10min a 2000 rpm e descartado o plasma. As hemácias foram lisadas através da adição de uma solução de NH_4Cl 0.144M (5 vezes o volume de células) e NH_4HCO_3 0.01M (0.5 vezes o volume de células). A mistura foi centrifugada por 15min a 3000 rpm e o sobrenadante desprezado, procedimento que se repetiu até que o precipitado de leucócitos ficasse claro. Após esta fase, procedeu-se a extração de DNA genômico conforme protocolo do Dnazol^R (Life Technologies). O DNA foi precipitado com adição de 30ml etanol absoluto gelado, lavado com etanol 70% e solubilizado em um volume de água desionizada proporcional ao tamanho do precipitado.

Determinação Polimorfismo no Gene *PSGL-1*

A genotipagem do VNTR foi determinada usando dois primers PSGL1-F (5'-cctgtccacggattcagc-3') e PSGL1-R (5'-gggaatgccctgtgagtaa-3') como descrito por Afshar-Kharghan et al [30] que delimita a região do VNTR (coordenadas Gene Bank 576-1134),

(Anexo 4). Amplificação do DNA genômico foi realizada nas seguintes condições: DNA 100-500ng, Primers 0.2 μ M, dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 2mM, Tris-KCl 40 μ M, Taq 0.02U/ μ l, H₂O qsp 50 μ l As condições de amplificação foram: 94°C-2min (1 ciclo), 94°C-30s, 57°C-30s, 72°C-1min (35 ciclos), seguindo um período de extensão a 72°C por 5min. O produto do PCR foi separado por eletroforese em gel de acrilamida 7% e corado com Brometo de Etídio, sendo identificados 3 bandas de 558bp, 528bp e 498bp – denominando os alelos A, B e C respectivamente.

Determinação dos Polimorfismos de Fragmentos de Restrição (RFLP) por Digestão Enzimática: Polimorfismo do Gene ***CD-18*** (C1323T).

Para a determinação deste polimorfismo foram desenhados os primers CD18R (5'-gagaaagtgaccactcaaggc-5') e CD18F (5'-ctgcgtgtgtcacatgtcctctg-3') compreendendo a região 21561-20742 (gene Bank NT 011515) (Anexo 4). Amplificação do DNA genômico foi realizada nas seguintes condições: DNA 100-500ng, Primers 0.1 μ M, dNTPs 100 μ M, MgCl₂ 2mM, Tris-KCl 40 μ M, Taq 0.02U/ μ l, H₂O qsp 50 μ l. As condições do PCR foram: 94°C-2min (1 ciclo), 94°C-30s, 64°C-30s, 72°C-1min (35 ciclos), seguindo um período de extensão a 72°C por 5 min. Uma alíquota de 10 μ l do PCR é digerida com 4UI da enzima *MBO II* por 12horas. A digestão do fragmento de PCR (820pb) resulta em fragmentos de 113,237 e 470pb para o alelo T e fragmentos de 113 e 707pb para o alelo C. Separação dos fragmentos é feita por eletroforese em gel agarose a 2% e corado com brometo de etídio.

Determinação dos Polimorfismos (K469E,G241R) no gene *ICAMI* por “Conformation Sensitive Gel Electrophoresis” (CSGE).

Para determinação desses polimorfismos foram construídos os primers IC 241F [5'-gctcacacctttctctctccc-3'] e IC 241R [tcgttgccataggtgactgtg-3'] (polimorfismo G241R compreendendo a região 739-549 gene bank X59288) e primers IC 469F [3'-tcaagtgtctaaaggatggcac-3'] e IC 469R [ggtgaggattgcattaggtcc-3'] (polimorfismo K469E compreendendo a região 1633-1429), (anexo 4). Para ambas regiões a amplificação do DNA genômico foi realizada nas seguintes condições: DNA 100-500ng, Primers 0.1µM, dNTPs 100µM, MgCl₂ 2mM, Tris-KCl 40µM, Taq 0.02U/µl, H₂O qsp 50µl. As condições do PCR foram: 94°C-2min (1 ciclo), 94°C-30s, 58°C-30s, 72°C-1min (35 ciclos), seguindo um período de extensão a 72°C por 5 min. Os alelos são separados por CSGE em gel de acrilamida a 10% e corada com brometo de etídio. CSGE é um método para detecção em produtos de PCR, de uma única base não pareada. O ensaio baseia-se no efeito que solventes levemente desnaturantes, em um tampão apropriado, podem acentuar a mudança conformacional produzida pelo não pareamento de uma base no DNA dupla fita e portanto, aumentar a migração diferencial no gel de eletroforese dos heteroduplexes e homoduplexes[40]. Este procedimento tem a vantagem sobre outros métodos de triagem de mutação por ser simples, não requerem preparação do produto de PCR, não usar radioatividade e ser possível a aplicação de fragmentos de PCR maiores que em Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).

Determinação do Polimorfismo MPO A-463G

Foi levada a efeito com os “primers” MPO-F (5'-cggtataggcacacaatggtag-3') e MPO-R (5'-gcaatggttcaagcgattcttc-3') conforme descrito por London et al [38] e amplificado nas seguintes condições: DNA 100-500ng, Primers 0.24µM, dNTPs 50µM, MgCl₂ 1.5mM, Tris-HCl 50µM, (NH₄)₂SO₄ 20mM, Taq 0.04U/µl, H₂O qsp 50µl. As condições do PCR foram: 94°C-2min (1 ciclo), 94°C-30s, 56°C-30s, 72°C-1min (35 ciclos), seguindo um período de extensão a 72°C por 5 min. Os alelos são separados por CSGE em gel de acrilamida a 10% e corado com brometo de etídio.

Os produtos de PCR dos alelos homozigotos e heterozigotos dos genes em estudos foram seqüenciados no sistema MegaBace 1000^R seguindo protocolo padrão descrito abaixo.

Sequenciamento DNA

O sistema de sequenciamento utilizado foi o do equipamento MegaBace 1000^R (www.apbiotech.com). Este é baseado no método do didesoxinucleotídeo de terminação de cadeia. Neste procedimento cada molécula de terminação é marcado com fluoresceína como grupo doador e com um aceptor rodamina (rodamina 110, rodamina-6-G, tetrametil rodamina e rodamina X) . Antes de proceder o sequenciamento o produto do PCR é purificado com o kit da Quiagen. Para o sequenciamento as condições de reação foram: primer (1pmoles), reagente Dyenamic ET terminator (4µl) e DNA (10 a 50 nmoles) para volume final de 15µl. Em seguida, perfaz 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 95°C-20'',58°C-15'', 60°C-1'. Os didesoxinucleotídeos marcados não incorporados são removido com a precipitação com 50µl etanol absoluto e 2µl de acetato de amônio 7,5M e

centrifugado a 4000 rpm a 4°C. O precipitado é lavado com etanol 70% 100µl, secado e resuspenso com 10µl de solução de formamida 70% (1mM EDTA). Finalmente, faz-se uma desnaturação por 3min a 65°C e insere-se a placa no sistema Megabace. Após o término do sequenciamento os dados são analisados pelo software Cimaron 1.43^R.

Análise Estatística

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o Statcalc do programa epi info (www.cdc.gov). Os dados dos grupos são analisados com teste qui-quadrado para examinar associação entre AVC e FVO e o polimorfismo. Teste exato de Fisher foi aplicado quando o valor da variável for menor do que cinco.

Teste de regressão logística foi aplicado para analisar o gene MPO com as variáveis tempo de acompanhamento(TAC) e infecções. Teste χ^2 foi realizado para comparar as distribuições de frequências entre os grupos. O valor de $P \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. O teste de Wilcoxon foi realizado para verificar diferenças dos níveis de Hb e HbF entre os grupos.

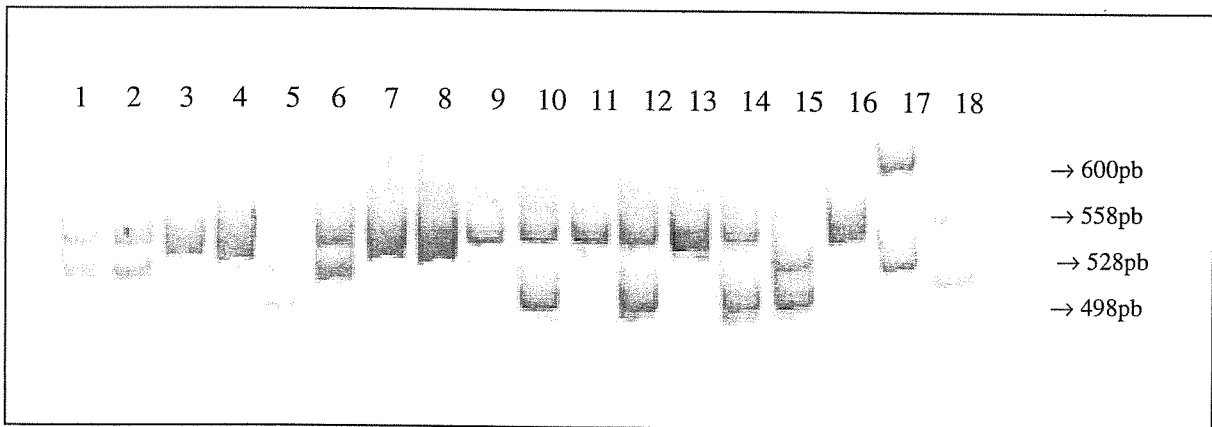
V. RESULTADOS

Polimorfismo do Gene *PSGL-1*:

A amplificação da região do VNTR resultou na identificação de 3 bandas – 558pb, 528pb e 498pb – denominados alelos A, B e C respectivamente (Fig. 3). Detectamos 6 possíveis combinações de alelos na população estudada. O sequenciamento dos homozigotos revela que no Alelo A não há deleção dos decâmeros, o alelo B perde o 2º decâmero e o alelo C perde o 9º e 10º decâmero (anexo 5). As frequências dos alelos e genótipos dos grupos com AF e controle são sumarizadas nas tabelas 1 e 2. Entre os pacientes com AF foi observada a seguinte distribuição genotípica: 41.7% AA, 36.9% AB, 14.6% AC, 2.9% BB, 2.9% BC e 1% CC. A comparação das frequências dos alelos de cada polimorfismo entre o grupo controle e os grupos com AF não mostrou diferenças significativas. Os pacientes com AF foram divididos inicialmente em dois grupos: pacientes em que ocorre AVC (AF+AVC) e pacientes sem ocorrência de AVC (AF-AVC). Posteriormente os pacientes foram divididos em outros dois grupos: pacientes em que foram detectados, pelo menos uma vez, um dos seguintes eventos: AVC, STA, NACF e Priapismo (AF+FVO) e pacientes em que não foram registradas essas complicações (AF-FVO). Observou-se que o grupo AF+AVC apresenta maior proporção do genótipo AB do que o grupo sem AVC, mas os valores não são suficientes para alcançar significância estatística. A análise do genótipo não evidenciou uma significativa prevalência do genótipo AA nos pacientes falciforme com AVC. O genótipo AA mostrou-se estar associado significativamente [P=0.02 IC95% OR=0.3 (0.1-0.9)] com (AF+FVO), mas não com o grupo de (AF+AVC). A comparação AA\AB versus outros genótipos não resultou em dados significativos em nenhum dos grupos analisados. A análise dos alelos revela que há associação significativa entre o alelo B e o grupo com (AF+FVO) [P=0.04 IC95% OR=2 (1-4)] e não significativo com o grupo (AF+AVC) [P=0.09 IC95% OR=2 (0.8-4.9)]. O alelo A não está associado à ocorrência de AVC, mas

parece está associado a menor frequência de ocorrência de FVO (AF+FVO) [P=0.03 OR=0.5 (0.2-0.9)].

Fig. 3 Padrão de Migração em Gel de Acrilamida a 7% do produto de PCR da região de VNTR do gene PSGL-1.



Genótipo AA – linhas 3, 4, 9, 11, 13, 16

Genótipo AB – linhas 1, 2, 6,

Genótipo AC – linhas 10, 12, 14

Genótipo BC – linhas 5, 15

Marcadores de 50-600pb (linha 17) e Genótipo AC (linha 18).

Tab.1: Frequência dos genótipos e alelos para o polimorfismo no VNTR do gene *PSGL-1* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem AVC.

Genótipos	AF-AVC N = 87 (%)	AF+AVC N = 16 (%)	Controles N = 48 (%)	Teste Fisher
AA	39 (44.9)	4 (25.0)	32 (66.6)	NS
AB	30 (34.5)	8 (50.1)	12 (25.0)	NS
AC	13 (14.9)	2 (12.5)	3 (6.3)	NS
BB	2 (2.3)	1 (6.2)	0 (0)	NS
BC	2 (2.3)	1 (6.2)	1 (2.1)	NS
CC	1 (1.1)	0 (0)	0 (0)	NS
Alelos				
A	121 (69.5)	18 (56.3)	79 (82.3)	NS
B	36 (20.7)	11 (34.4)	13 (13.5)	P=0.09 OR 2(0.8-4.9)
C	17 (9.8)	3 (9.4)	4 (4.2)	NS

NS: não significativo.

Tab.2: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo no VNTR do gene *PSGL-1* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem FVO.

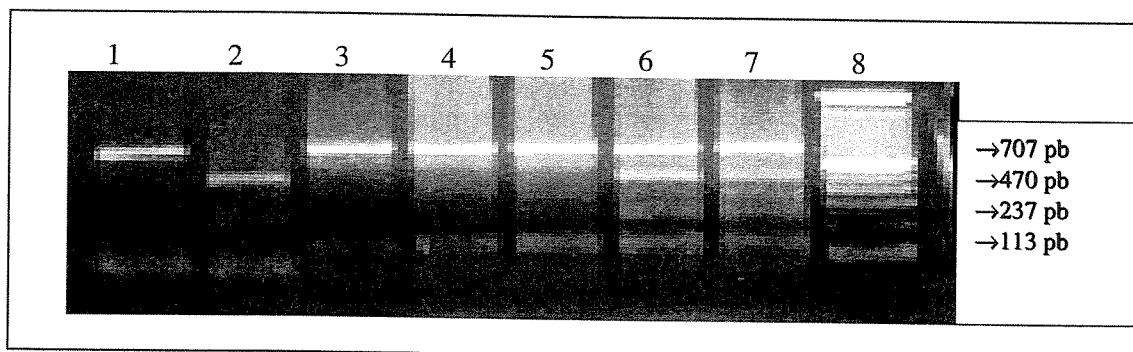
Genótipos	AF-FVO N = 70 (%)	AF+FVO N = 33 (%)	Controles N = 48 (%)	Teste Fisher
AA	34 (48.5)	8 (24.2)	32 (66.6)	P=0.02 OR=0.4 (0.1-0.9)
AB	23 (32.9)	15 (45.4)	12 (25.0)	NS
AC	10 (14.3)	5 (15.2)	3 (6.3)	NS
BB	2 (2.9)	2 (6.0)	0 (0)	NS
BC	1 (1.4)	2 (6.0)	1 (2.1)	NS
CC	0 (0)	1 (3.0)	0 (0)	NS
Alelos				
A	101 (73.2)	36 (54.5)	79 (82.3)	P=0.03 OR=0.5 (0.3-1.0)
B	26 (18.8)	21 (31.8)	13 (13.5)	P=0.04 OR=2 (1-4)
C	11 (8.0)	9 (13.6)	4 (4.2)	NS

NS: não significativo.

Polimorfismo C1323T do gene *CD18*

Para avaliação do polimorfismo C1323T do gene *CD18* foram genotipados um total de 103 pacientes (tab. 3 e 4). O grupo controle composto de 48 indivíduos teve a seguinte distribuição: genótipo CC em 24 (63.1%), CT em 12 (31.6%) e TT em apenas 2 (5.3%). Não há diferenças significativas entre os grupos com AF e o controle ($P=0.56$). Nenhuma associação significativa entre os genótipos e alelos com AVC e FVO foi encontrada.

Fig. 4: Eletroforese em gel de agarose 2% dos fragmentos digeridos com a enzima de restrição *MBO II* do produto de PCR da região do polimorfismo C1323T (V441V) do gene *CD18*.



Genótipo CC – linhas 1, 3, 4, 5

Genótipo TT – linha 2

Genótipo TC – linhas 6, 7

Marcador de 100pb – linha 8

Tab.3: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo C1323T do gene *CD18* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem AVC.

Genótipos	AF - AVC n=87 (%)	AF + AVC n=16 (%)	Controles n=48 (%)	Teste Fisher
CC	59 (67.2)	10 (62.6)	24 (63.1)	NS
CT	27 (31.0)	5 (31.2)	12 (31.6)	NS
TT	1 (1.1)	1 (6.2)	2 (5.3)	NS
Alelos				
C	145 (83.3)	25 (78.1)	60 (78.9)	NS
T	29 (16.7)	7 (21.9)	16 (21.1)	NS

Tab.4: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo C1323T do gene *CD18* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem FVO.

Genótipos	AF-FVO n=70 (%)	AF+FVO n=33 (%)	Controles n=48 (%)	P (FVO)
CC	46 (65.7)	23 (69.6)	24 (63.1)	NS
CT	23 (32.9)	9 (27.2)	12 (31.6)	NS
TT	1 (1.4)	1 (3.0)	2 (5.3)	NS
Alelos				
C	117 (82.1)	59 (83.3)	60 (78.9)	NS
T	25 (17.9)	11 (16.7)	16 (21.1)	NS

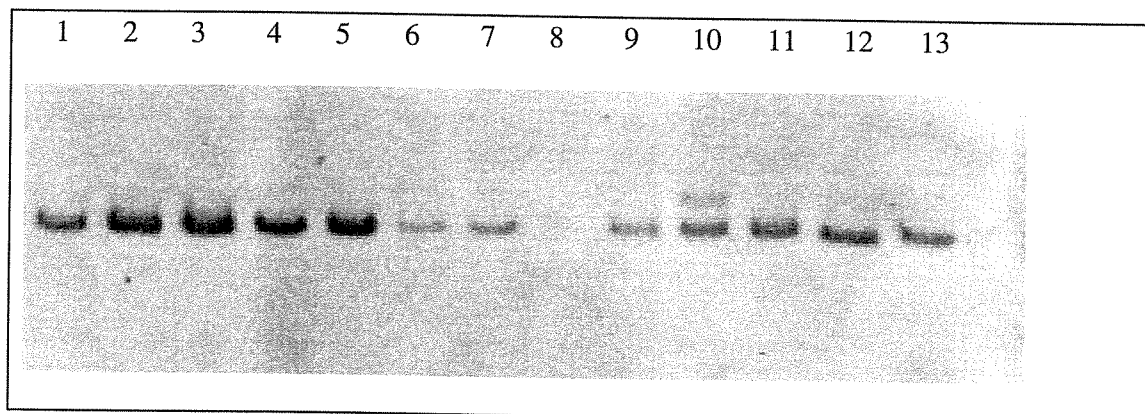
NS: não significativo

Polimorfismo G241R e K469E do gene *ICAM-1*

A genotipagem do polimorfismo *ICAM1* G241R revelou que o genótipo RR (AA) é raro, 1.9% entre os pacientes AF e 2.1% no grupo controle (Fig.5 e tab. 5 e 6). O alelo R aparece no grupo controle (9.2%) em maior proporção do que nos pacientes AF (5.3%), mas esta diferença não é significativa ($P=0.17$). Foi encontrada a seguinte distribuição do alelo 241R entre os grupos: AF-FVO 5%, AF-AVC 5.7%, AF+AVC 3.1% e AF+FVO 5.7%. A análise entre os grupos com e sem complicações vaso oclusivas não mostrou associações significativas.

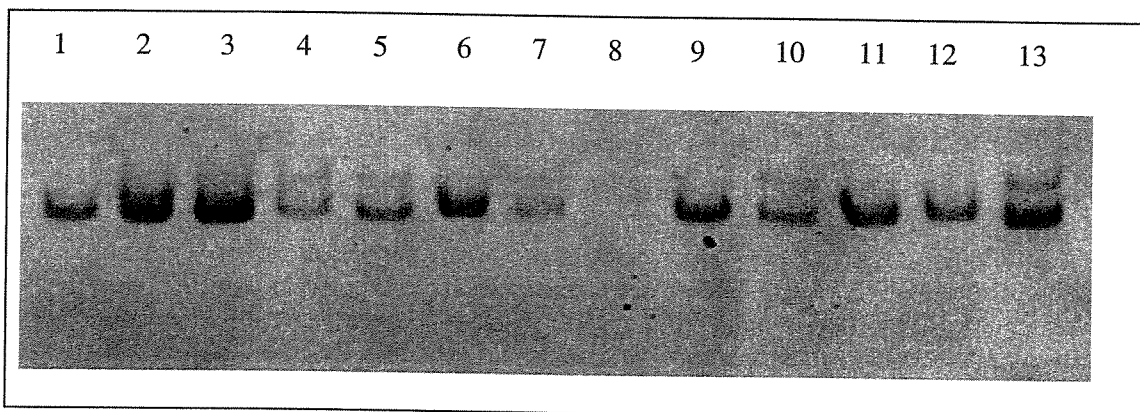
O estudo do polimorfismo *ICAM1* K469E não mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e pacientes com AF (fig.6 e tab. 7 e 8). A análise estatística evidenciou associação significativa do genótipo K469E com AVC [$P=0.02$ IC95% OR=3.6 (1.1-12.3)], mas não com o grupo AF+FVO. A análise dos alelos não mostrou correlação significativa entre os pacientes com AVC ou FVO.

Fig.5: CSGE em gel de acrilamida a 10% do PCR da região do polimorfismo G241R (G657A) do gene *ICAM-1*.



Homoduplex Genótipo GG ou AA: linhas – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13. Esses genótipos foram diferenciados pelo sequenciamento. Heteroduplex Genótipo GA: linha – 10.

Fig.6: CSGE em gel de acrilamida a 10% do PCR da região do polimorfismo K469E (G1548A) do gene *ICAM-1*.



Homoduplex Genótipo GG ou AA: linhas – 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11, 12. Esses genótipos foram diferenciados pelo sequenciamento.

Heteroduplex Genótipo GA: linhas – 4, 5, 10, 13.

Tab.5: Frequência dos genótipos e alelos do Polimorfismo G241R do gene *ICAM-1* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem AVC.

Genótipos	AF – AVC n=87 (%)	AF + AVC n=16 (%)	Controles n=48 (%)	P (AVC)
GG	79 (90.8)	15 (93.4)	40 (83.3)	NS
GR	6 (6.9)	1 (6.2)	7 (14.6)	NS
RR	2 (2.3)	0 (0)	1 (2.1)	NS
Alelos				
G	164 (94.3)	31 (96.9)	87 (90.6)	NS
R	10 (5.7)	1 (3.1)	9 (9.4)	NS

NS: não significativo

Tab.6: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo G241R do gene *ICAM1* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem FVO.

Genótipos	AF-FVO n=70	AF+ FVO n=33	Controles n=48	P (FVO)
GG	64 (91.4)	30 (90.9)	40 (83.3)	NS
GR	5 (7.1)	2 (6.0)	7 (14.6)	NS
RR	1 (1.4)	1 (3.0)	1 (2.1)	NS
Alelos				
G	133 (95)	66 (93.9)	87 (90.6)	NS
R	7 (5)	4 (6.1)	9 (9.4)	NS

NS: não significativo.

Tab.7: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo K469E do gene *ICAM1* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem AVC.

Genótipos	AF - AVC n=87 (%)	AF + AVC n=16 (%)	Controle n=42 (%)	P (AVC)
KK (AA)	53 (61)	7 (43.8)	27 (60.0)	NS
KE (AG)	23 (26.4)	9 (56.2)	15 (33.3)	OR=3.6 (1.1-12.3) P=0.02
EE (GG)	11 (12.6)	0 (0)	3 (6.7)	NS
Alelos				
K	138 (75.4)	23 (71.9)	69 (76.7)	NS
E	45 (24.6)	9 (28.1)	21 (23.3)	NS

NS: não significativo

Tab.8: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo K469E do gene *ICAM1* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem FVO.

Genótipos	AF-FVO N=70 (%)	AF+ FVO n=33 (%)	Controle n=42 (%)	P (FVO)
KK	40 (57.1)	20 (60.6)	27 (60.0)	NS
KE	21 (30)	11 (33.3)	15 (33.3)	NS
EE	9 (12.9)	2 (6.0)	3 (6.7)	NS
Alelos				
K	101 (72.1)	53 (77.3)	69 (76.7)	NS
E	39 (27.9)	16 (22.7)	21 (23.3)	NS

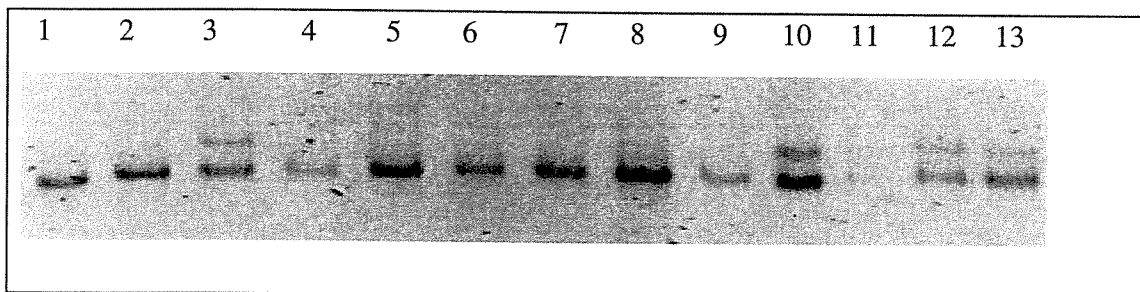
NS: não significativo

Polimorfismo do Gene *MPO*

Na avaliação do polimorfismo G-463A do gene *MPO* obteve-se para a frequência dos genótipos entre os pacientes com AF 54.6% GG, 39.2% GA e 6.2% AA (fig.7 e tab.9). A distribuição das frequências dos genótipos nos pacientes falciformes é similar a encontrada no grupo controle, GG 60%, AG 34% e AA 6%. Portanto, não há diferenças significativas entre o grupo controle e os pacientes com AF. A comparação inicial foi realizada com a identificação de dois grupos de pacientes: um primeiro grupo de pacientes que não apresentou nenhuma infecção com necessidade de hospitalização durante todo seguimento dos pacientes e um segundo grupo onde ocorreu pelo menos 1 episódio de hospitalização devido a infecção. A análise estatística empregada foi a Regressão Logística que leva em consideração o tempo de acompanhamento (TAC) de cada paciente. O TAC não foi igual nos dois grupos (P=0.004), portanto o teste de regressão logística na análise é indispensável. A análise das seguintes variáveis: níveis de HbF, Hb, haplótipos, UMI e Alfa

Talassemia demonstraram que os grupos são significativamente diferentes apenas para a presença de UMI (P=0,003). O genótipo GA está fortemente associado com risco de infecções [P=0.009; OR=3.2 (1.3-7.7)], enquanto o genótipo GG apresentou associação significativa com ausência de infecção (P=0.004; OR=0.3). A presença do genótipo AA ou AG demonstrou associação significativa com risco de infecção [P=0.005 OR=3.8(1.6-9.3)]. Quando se leva em consideração o TAC a análise de regressão logística efetuada demonstra associação fortemente significativa entre a presença genótipo AG e o grupo com infecções [P=0.005 OR=3.8 (1.5-9.6)]. O mesmo se repete com a análise dos alelos, estando o alelo A associado [P=0.009;OR=2.5(1.3-4.9)] com o grupo de infecções e o alelo G ao grupo sem infecções . Não houve significância estatística quando testado o genótipo AA isoladamente, provavelmente em virtude do baixo número de pacientes que apresentaram esse genótipo.

Fig.7: CSGE em gel de acrilamida a 10% do PCR da região do polimorfismo G-463A do gene *MPO*.



Homoduplex Genótipo GG ou AA: linhas – 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9. A diferenciação entre esses genótipos foi realizada pelo sequenciamento de DNA em todos os casos.

Heteroduplex Genótipo GA: linhas – 3, 10, 11, 12, 13.

Tab.9: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo G-463A do gene *MPO* em controles e em pacientes portadores de AF com ou sem infecções.

Genótipos	Sem Infecções N=64 (%)	Com Infecções N=33 (%)	Controles N=50	Teste Fisher*	Regressão Logística com a variável TAC
AA	3 (4.7)	3 (9.1)	3 (6.0)	OR=2 (0.4-10.7) P=0.23	OR=3.8 (0.7-21.6) P=0.13
GA	19 (29.7)	19 (57.6)	17 (34.0)	OR=3.2 (1.3-7.7) P=0.009	OR=3.8 (1.5-9.6) P=0.005
GG	42 (65.6)	11 (33.3)	30 (60.0)	OR=0.3 (0.1-0.7) P=0.002	
Alelos					
A	25 (19.5)	25 (37.9)	16 (25.0)	OR=2.6 (1.1-6.1) P=0.01	
G	103 (80.5)	41 (62.1)	48 (75.0)	OR=0.4 (0.2-0.9) P=0.01	

Com o objetivo de avaliar dois grupos de pacientes com exatamente o mesmo período de seguimento foram identificados apenas os pacientes com acompanhamento no período de 1996 a 1999. Esses pacientes foram analisados em três grupos:

- 1- Pacientes que não apresentaram infecção no período.
- 2- Pacientes que apresentaram uma ou mais infecções no período.
- 3- Pacientes que apresentaram duas ou mais infecções no período.

Na tabela 10 são comparados os pacientes com AF acompanhados no mesmo período (1996-1999). Estes são divididos em 3 grupos: sem infecção, com 1 ou mais infecções e 2 ou mais infecções. A análise comparativa entre os três grupos, embora não revele diferenças estatisticamente significativas, sugere uma possibilidade de associação entre o genótipo AG e ocorrência de maior número de infecções (P=0.08).

Tab.10: Frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo G-463A do gene *MPO* em controles e em pacientes portadores de AF com ≥ 1 infecções, ≥ 2 infecções e sem infecções no período de 1996-1999.

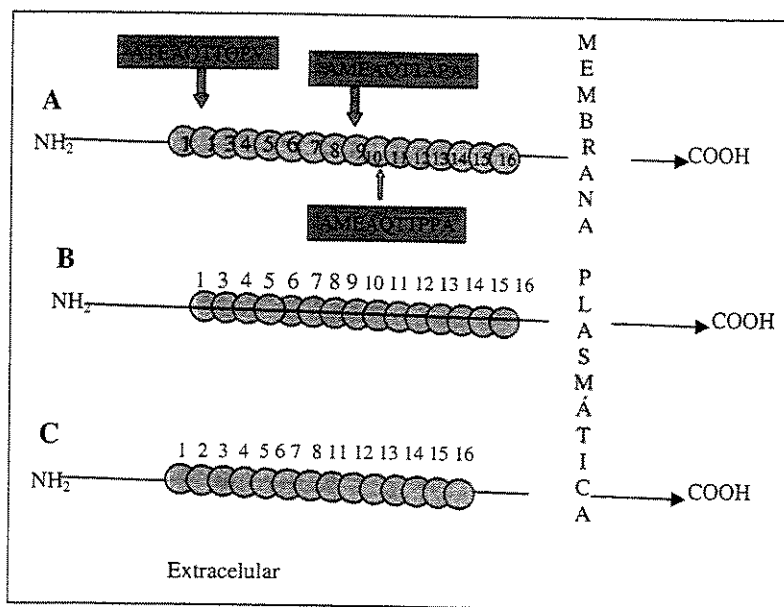
Genótipos	Sem Infecções N=41 (%)	1 ou + Infecções N=21 (%)	2 ou + Infecções N=10	Controles N=50	Teste Fisher* Para 1+ infec	Teste Fisher para 2+ infecções
AA	1 (2.4)	1 (4.8)	0 (0)	3 (6.0)	NS	NS
GA	15 (36.6)	11 (52.3)	7 (70)	17 (34.0)	OR=1.9 P=0.23	OR=4 P=0.08
GG	25 (61.0)	9 (42.9)	3 (30)	30 (60.0)	OR=0.5 P=0.17	OR=0.3 P=0.16
Alelos						
A	17 (20.7)	13 (40.0)	7 (35)	16 (25.0)	OR=1.7 P=0.21	OR=2.1 P=0.18
G	65 (79.3)	29 (60.0)	13 (65)	48 (75.0)	OR=0.6 P=0.21	OR=0.5 P=0.18

NS: Não Significativo, OR: odds ratio

VI. DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

O polimorfismo do gene *PSGL-1* foi previamente descrito como possível fator de risco para doença isquêmica cerebrovascular[32]. Os resultados destes estudos revelaram que os alelos menores (B e C) parecem estar associados com menor risco para o desenvolvimento de AVC. O estudo funcional da interação plaquetas e neutrófilos demonstrou que leucócitos portadores do alelo C exibem menor capacidade de ligação às plaquetas ativadas [32]. O polimorfismo no VNTR do gene *PSGL-1* é similar ao do gene *GP Iba*. Neste último, o complexo que se repete é formado por 13 aminoácidos. Estima-se que cada aminoácido adicione cerca de 2.5Å ao comprimento da molécula[29]. A análise por analogia a este polimorfismo permite estimar que o VNTR no *PSGL-1* deve estender a molécula em 0-25-50Å, correspondendo aos alelos C, B e A respectivamente, como esquematizado na Fig. 8.

Fig.8: Representação esquemática dos alelos A, B e C do gene *PSGL-1*.



Neste estudo encontramos uma frequência dos alelos A, B e C na população controle de descendentes de africanos de 79% do alelo A, 14% do alelo B e 4% do alelo C, semelhantes ao relatado em outras populações pesquisadas[30]. Quando os grupos de pacientes com anemia falciforme foram comparados, observamos que o alelo B parece estar significativamente associado a ocorrência de fenômenos vaso oclusivos. Essa associação é diferente daquela observada nos estudos anteriores, onde o alelo A estaria associado a maior risco de AVC em pacientes não portadores de hemoglobinopatias[32]. Tendo em vista a complexidade do processo vaso oclusivo na anemia falciforme existe a possibilidade disto contribuir de alguma forma para agravar esse fenômeno. No entanto, nossos dados são preliminares e certamente será necessário estudo multicêntrico com maior número de pacientes para alcançarmos algum tipo de dado conclusivo.

O polimorfismo 1323C/T do gene da molécula de adesão leucocitária *CD18* foi avaliado na literatura como um possível fator de risco para trombose secundária a aterosclerose, onde o alelo 1323T parece estar associado a menor incidência de oclusão vascular [33, 34]. Os resultados aqui obtidos nos pacientes portadores de AF não mostraram correlação com fenômenos vaso oclusivos.

Polimorfismos no gene *ICAM1* foram investigados em várias doenças onde o papel da resposta inflamatória é importante, como exemplo as doenças autoimunes[35, 41, 42]. Em alguns casos estes polimorfismos parecem ser marcadores de gravidade de algumas doenças inflamatórias em determinadas populações[43-46]. No grupo de pacientes aqui analisados, o polimorfismo G241R não mostrou associação com AVC ou FVO. O polimorfismo G241R ocorre no domínio 3 da imunoglobulina e tem sido demonstrado como fator importante na ligação ao Mac1 (CD11b/CD18) ou receptor de complemento tipo 3.

O polimorfismo K469E ocorre no domínio 5 da proteína ICAM1 e para esta posição não se conhece interação a um sítio ligante conhecido. Este estudo evidenciou possível associação do genótipo K469E e a ocorrência de AVC em pacientes com AF (P=0.02 OR=3.6). Esta associação, descrita pela primeira vez neste trabalho, acrescenta mais um fator com provável função indicadora de ocorrência de AVC em pacientes com AF. Vários estudos recentes mostram alguns outros fatores semelhantes[7, 47].

A MPO é uma enzima encontrada primariamente em lisossomas de neutrófilos. A substituição (G para A) na região promotora (-463bp do início do gene MPO) diminui sua expressão por destruir o sítio de ligação para o fator de transcrição SP1[38]. O polimorfismo -463A foi implicado como potencial fator de risco para infecção em estudo com pacientes imunodeprimidos [39]. Na avaliação do SNP G-463A na região promotora do gene MPO em pacientes portadores de AF, os resultados deste trabalho sugere fortemente que em pacientes heterozigotos GA, existe provável maior incidência de eventos infecciosos (P=0.005;OR=3.8). Esta associação também se verifica na análise do alelo A (P=0.03). Pacientes com genótipo AA ou AG aparentemente tem elevado risco de eventos infecciosos (P=0.002;OR=3.8), enquanto o genótipo GG parece estar associado à ausência de infecções (P=0.002 OR=0.3). O fato da distribuição dos genótipos entre os pacientes falciformes e o grupo controle serem semelhantes indica que a predisposição a infecções seja realmente devida a presença do alelo A. O polimorfismo -463A diminui a expressão da MPO que por sua vez leva a redução da capacidade bactericida in vitro dos leucócitos. Estudos anteriores em outras doenças apontavam para maior susceptibilidade a infecções em pacientes portadores dos genótipos GA ou AA. Apesar de os dados “in vitro” indicarem que a deficiência da MPO em neutrófilos parece não ser vital na função antimicrobica, é possível que, “in vivo” a atividade da MPO possa modular a resposta inflamatória

diminuindo o dano celular provocado pelas bactérias. O sistema MPO-H₂O₂-haletos é um potente sistema microbicida e sua falta ou diminuição de sua atividade em pacientes que já possuem uma debilitada resposta imune pode ainda mais predispor-los a eventos infecciosos mais graves.

Os dados deste trabalho revelam, pela primeira vez na literatura, que um fator relacionado a função neutrófilos pode estar associado a morbidade na AF. Se confirmados em estudos multicêntricos, esses dados poderiam indicar nos pacientes com maior risco deveria ser introduzido antibioticoterapia profilática independente da idade.

Em seu conjunto, os resultados deste trabalho contribuem para mostrar a complexidade dos fatores envolvidos na evolução clínica da anemia falciforme e sugere fortemente novos fatores de gravidade nessa doença.

VI. ANEXOS

Anexo 1

Num	matricula	sexo	Idade(anos)	NACF	AVC	P-S	PSGL- I	CD18	icam1241	icam1469
5	272777-3	F	27	sim	nao	nao	BB	CC	GG	AA
6	229393-2	M	35	nao	nao	nao	AC	CC	GG	AG
16	043689-5	F	32	sim	sim	nao	AB	CC	GG	AA
19	119607-4	M	45	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
36	236179-1	F	31	nao	nao	nao	AC	CC	GG	GG
42	422698-9	F	25	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AG
52	368160-7	F	27	nao	sim	nao	AA	CC	GA	AG
53	571819-1	M	18	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AG
68	597364-0	F	37	sim	nao	nao	AB	CC	AA	AA
72	454897-5	F	26	nao	nao	nao	AC	CC	GG	AA
73	465706-5	M	18	nao	nao	nao	AA	TC	GG	GG
76	286435-2	F	38	sim	nao	nao	AC	CC	GG	AA
77	417591-2	F	42	sim	nao	nao	AC	TC	GA	AA
79	350261-3	M	22	nao	nao	sim	AB	TC	GG	GG
81	248772-1	F	37	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
85	337078-7	M	26	nao	nao	sim	BC	CC	GG	AG
88	393701-6	F	12	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
89	255483-9	M	21	nao	nao	nao	AA	CC	GA	AA
91	676178-5	F	27	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
92	545602-6	F	8	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
93	209830-4	F	31	nao	nao	nao	AB	TT	GG	AA
95	540315-0	F	32	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
96	497828-7	M	20	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
99	631290-2	M	19	nao	nao	nao	AB	TC	GG	GG
100	562133-0	M	40	sim	nao	nao	AB	TC	GG	AA
101	603040-5	M	7	nao	nao	nao	AB	TC	GG	AA
102	318867-5	M	27	nao	nao	nao	AC	TC	GG	AA
103	564999-6	M	26	sim	nao	nao	AA	CC	GG	AA
105	268581-6	F	26	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
106	584924-7	F	31	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
107	575037-9	F	6	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
108	568787-9	F	36	nao	nao	nao	AC	CC	GG	AA
109	124287-3	F	20	nao	nao	nao	AC	TC	GG	AA
110	526725-5	M	24	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
111	519518-3	M	43	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
112	634846-8	M	39	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AG
113	651703-5	M	36	nao	nao	nao	AC	CC	GG	AG
114	463706-5	M	14	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
115	355826-4	F	33	nao	nao	nao	BC	CC	GG	AA
116	573901-0	F	31	sim	nao	nao	AA	TC	GG	GG
117	639025-1	M	31	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AG
118	649427-1	M	28	nao	nao	nao	AB	TC	GG	AG
119	674758-7	F	29	nao	nao	nao	BB	CC	GG	AA
124	693575-2	M	18	sim	nao	nao	AB	CC	GG	AA
125	689512-4	M	20	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
126	694044-0	F	20	nao	nao	nao	AC	TC	GG	AA
127	702286-3	M	30	sim	nao	nao	AA	CC	GG	AG
128	676388-2	F	30	nao	nao	nao	AA	CC	GG	GG
129	702666-7	M	30	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AG

130	337983-6	M	10	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AG
132	475798-6	F	42	nao	nao	nao	AB	TC	AG	AG
134	716287-3	M	21	nao	nao	nao	AA	TC	GG	GG
135	619384-9	F	7	nao	sim	nao	AB	TC	GG	AG
138	725132-3	F	23	nao	nao	nao	AA	CC	AG	AG
139	709106-6	F	18	nao	nao	nao	AA	CC	AG	AG
140	722985-9	F	20	nao	nao	nao	AA	CC	GG	GG
41	340362-5	M	25	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
45	263446-5	M	32	nao	nao	nao	BB	CC	GG	AA
50	346670-2	F		sim	nao	nao	AB	CC	GG	AA
51	373542-2	F	51	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
54	163828-8	F	25	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AG
56	121637-1	F	20	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
65	319936-1	F	26	sim	nao	nao	AB	CC	GG	AA
69	162351-3	M	36	nao	nao	sim	AA	CC	GG	AA
78	480772-5	F	29	sim	nao	nao	AC	CC	GG	AA
80	478565-8	M	25	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AG
83	521614-5	M	42	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
84	540010-2	M	32	nao	nao	nao	AB	TC	GG	GG
86	250078-5	M	27	sim	sim	nao	BB	CC	GG	AG
87	522125-5	M	35	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
90	540927-9	F	24	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
98	449770-8	M	23	nao	nao	nao	AB	TC	GG	GG
2	263737-2	M	24	nao	nao	sim	AB	CC	GG	AA
8	191149-0	F	33	nao	nao	nao	AB	CC	AA	AA
9	096016-3	M	19	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AA
20	019983-7	F	40	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
24	006053-9	M	52	sim	nao	nao	CC	CC	GG	AA
35	104066-1	F	35	nao	nao	nao	AB	CC	GG	AG
37	037625-9	F	38	nao	nao	nao	AB	TC	GG	AA
38	028618-5	M	33	nao	nao	nao	AC	CC	GG	AG
71	385165-2	M	37	nao	nao	nao	AB	CC	GG	GG
75	045228-1	F	28	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AG
94	378886-1	F	21	nao	sim	nao	AC	CC	GG	AG
136	723422-2	F	21	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
142	125458-1	M	18	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
148	749083-0	F	24	nao	nao	nao	AC	CC	GA	AG
149	657519-4	F	43	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
2s	FCM-USP	F	9	nao	sim	nao	AB	CC	GG	AA
3s	FCM-USP	F	9	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AG
4s	FCM-USP	F	7	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AA
5s	FCM-USP	M	22	nao	sim	nao	AA	TC	GG	AA
6s	FCM-USP	F	21	nao	sim	nao	AB	TC	GG	AA
7s	FCM-USP	F	11	nao	sim	nao	BC	CC	GG	AG
8s	FCM-USP	F	15	nao	nao	nao	AA	CC	GG	AG
9s	FCM-USP	M	7	nao	nao	nao	AB	TC	GG	AG
10s	FCM-USP	F	6	nao	nao	nao	AA	TC	GG	AA
11s	UNIFESP	M	18	nao	sim	nao	AA	CC	GG	AA
13s	UNIFESP	F		nao	sim	nao	AA	TC	GG	AG
15s	UNIFESP			nao	sim	nao	AB	TT	GG	AA
17s	UNIFESP			nao	sim	nao	AC	CC	GG	AA
18s	UNIFESP			nao	sim	nao	AB	CC	GG	AG
19s	UNIFESP			nao	sim	nao	AB	CC	GG	AG
20s	UNIFESP			nao	sim	nao	AB	TC	GG	AG

P-S: Priapismo ou STA

Anexo 2

Num	matricula	sexo	Idade (anos)	TAC (anos)	infec	MPO	HAPLOTIPO	HB (mg/dl)	HBF (mg/dl)	alfaTal	UMI
5	272777-3	F	27	13	sim	AG	BEN-CAR	8,2	8,1	sem	sim
6	229393-2	M	35	10	sim	GG	BEN-CAR	9,1	1,4	hete	nao
16	043689-5	F	32	6	nao	AG	BEN-CAR	7,3	4,4	sem	sim
19	119607-4	M	45	13	sim	GG	CAR-CAR	6,9	1,4	sem	sim
36	236179-1	F	31	13	sim	GG	BEN-CAR	6,5	2,7	sem	sim
52	368160-7	F	27	2	nao	GG	CAR-CAR	7,5	8,5	sem	nao
53	571819-1	M	18	7	sim	AG	CAR-ATP	8,8	11	sem	nao
57	381447-0	M	25	11	sim	GG	BEN-BEN	7,1	6,2	sem	nao
68	597364-0	F	37	6	nao	GG	BEN-CAR	9,6	13,3	sem	nao
72	454897-5	F	26	9	nao	AG	BEN-CAR	6,3	11,3	sem	nao
73	465706-5	M	18	8	nao	AG	CAR-CAR	8	5,5	hete	nao
76	286435-2	F	38	12	nao	GG	BEN-CAR	9,7	5	sem	nao
77	417591-2	F	42	10	nao	AG	BEN-CAR	7,8	10,7	sem	nao
79	350261-3	M	22	11	sim	AG	BEN-CAR	10,5	8,9	sem	nao
81	248772-1	F	37	12	sim	GG	BEN-CAR	10,3	2,2	sem	sim
85	337078-7	M	26	12	sim	GG	CAR-CAR	6,6	4,1	sem	sim
88	393701-6	F	12	10	nao	GG	BEN-CAR	7,4	6,4	sem	nao
89	255483-9	M	21	13	sim	AG	BEN-CAR	7,4	4	sem	nao
91	676178-5	F	27	1	nao	AG	CAR-CAR	13,8	0,6	hete	nao
92	545602-6	F	8	7	nao	GG	BEN-CAR	7,7	9,3	sem	nao
93	209830-4	F	31	11	sim	GG	CAR-CAR	8,4	2,5	sem	sim
95	540315-0	F	32	7	nao	AG	BEN-CAR	7	3,6	sem	nao
96	497828-7	M	20	8	nao	AG	BEN-CAR	8,3	20,3	sem	nao
99	631290-2	M	19	1	nao	AG	BEN-CAR	6,3	5	hete	nao
100	562133-0	M	40	4	sim	AG	BEN-BEN	10,2	10,8	sem	nao
101	603040-5	M	7	6	nao	AA	CAR-CAR	10,4	13	homo	nao
103	564999-6	M	26	7	nao	GG	CAR-CAR	7,5	1,7	sem	nao
104	186158-8	F	35	13	nao	GG	CAR-CAR	7,9	7,3	hete	nao
105	268581-6	F	26	13	nao	GG	CAR-CAR	8,2	11	sem	nao
106	584924-7	F	31	6	sim	AG	BEN-BEN	7,5	7	sem	nao
107	575037-9	F	6	7	nao	GG	BEN-BEN		8,3	sem	nao
108	568787-9	F	36	7	nao	GG	CAR-CAR			sem	sim
109	124287-3	F	20	9	nao	GG	BEN-CAR	6,9	4,7	sem	nao
110	526725-5	M	24	8	nao	GG	BEN-CAR	7,1	2,8	hete	nao
111	519518-3	M	43	8	nao	GG	BEN-BEN	11,2	12,9	sem	nao
112	634846-8	M	39	5	sim	AG	BEN-BEN	6,7	3,5	sem	nao
113	651703-5	M	36	5	nao	GG	BEN-CAR	7,1		sem	nao
114	463706-5	M	14	9	nao	GG	CAR-CAR		9,6	sem	nao
115	355826-4	F	33	11	nao	AG	CAR-CAR	6,3	1,1	sem	nao
116	573901-0	F	31	7	sim	GG	BEN-CAR	7,4		hete	nao
117	639025-1	M	31	5	nao	GG	BEN-BE	5,3	5	sem	nao
118	649427-1	M	28	3	nao	GG	BEN-CAR	8,9	5,4	sem	nao
119	674758-7	F	29	1	nao	GG	CAR-CAR	7,3	5,7	sem	nao
122	694288-8	M	21	2	nao	GG	BEN-CAR	7,95	5	sem	nao
124	693575-2	M	18	1	sim	AA	BEN-CAR	9,9	8,9	sem	nao
125	689512-4	M	20	2	nao	GG	BEN-CAR			sem	nao
126	694044-0	F	20	3	nao	GG	CAR-CAR	9,4	4,9	hete	nao
127	702286-3	M	30	1	nao	GG		10,1	4,9	sem	nao
128	676388-2	F	30	4	nao	GG	BEN-BEN	9,17	1,6	sem	nao
129	702666-7	M	30	4	nao	GG	BEN-BEN	8	1,4	sem	nao

130	337983-6	M	10	12	nao	GG	BEN-CAR	7,2	4,6	sem	nao
131	702214-0	M	28	4	nao	AA	BEN-BEN	10,5	1,2	sem	nao
133	619600-1	M	20	6	nao	AG	CAR-CAR	7,2	2,2	sem	nao
137	711457-5	F	31	1	nao	GG	ATP	13,4	0,4	sem	nao
138	725132-3	F	23	3	nao	GG	CAR-CAR	7,8	12,2	sem	nao
139	709106-6	F	18	3	sim	AG	BEN-BEN	9,5	5,5	hete	sim
140	722985-9	F	20	1	nao	AG	CAR-CAR	6,4		sem	sim
41	340362-5	M	25	12	nao	GG	BEN-CAR	5,6	2	sem	nao
50	346670-2	F	50	11	sim	AG	BEN-CAR	8	14	sem	sim
51	373542-2	F	51	11	nao	GG	CAR-CAR	6,2	6,1	sem	sim
54	163828-8	F	25	12	sim	AG	SEN-ATP	9	7,7	sem	nao
56	121637-1	F	20	10	sim	GG	BEN-BEN	8,2	1	hete	nao
58	398654-2	M	22	10	sim	AG	CAR-CAR	8,3	3,2	sem	sim
59	35880-6	F	25	11	sim	AG	BEN-CAR	6,8	4,2	sem	sim
65	319936-1	F	26	12	nao	GG	BEN-BEN	11,2	0,8	sem	nao
69	162351-3	M	36	11	nao	GG	CAR-CAR	8,1	3,2	hete	nao
78	480772-5	F	29	8	nao	GG	CAR-ATP	9,2	16	sem	nao
83	521614-5	M	42	8	sim	AG	BEN-CAR	8	8	sem	nao
84	540010-2	M	32	7	nao	AG	CAR-CAR	9,4	6,2	homo	nao
86	250078-5	M	27	10	nao	GG	BEN-BEN	10	2	sem	nao
87	522125-5	M	35	8	nao	AG	BEN-BEN	8,1	7,2	sem	nao
90	540927-9	F	24	7	nao	GG	BEN-CAR	6,9	4,1	sem	nao
98	449770-8	M	23	6	sim	AG	CAR-CAR	4,8		sem	nao
2	263737-2	M	24	13	nao	AG	BEN-CAR	6	6,6	sem	sim
8	191149-0	F	33	13	sim	GG	CAR-CAR	7,7	3,2	sem	nao
9	096016-3	M	19	13	sim	AG	BEN-CAR	9		sem	sim
24	006053-9	M	52	6	sim	AG	CAR-CAR	10,1	1,3	sem	sim
27	253771-0	F	19	2	nao	AG	BEN-CAR	7,5	12,2	hete	nao
29	397717-3	F	20	10	nao	AA	BEN-CAR	10	19,2	hete	sim
31	324645-7	M	26	6	sim	AG	CAR-CAR	7	10	homo	nao
32	624657-7	F	47	5	nao	GG	BEN-CAR	9,1	17,3	sem	nao
35	104066-1	F	35	9	sim	AA	CAR-CAR	7,8	0,9	hete	nao
37	037625-9	F	38	13	nao	GG	CAR-CAR	8,4	8,9	sem	nao
38	028618-5	M	33	13	nao	AG	CAR-CAR	10	0,6	hete	nao
71	385165-2	M	37	10	sim	AA	BEN-CAR	10,3	2,8	hete	nao
75	045228-1	F	28	9	sim	GG	CAR-CAR	6,9	6,7	sem	nao
94	378886-1	F	21	11	nao	GG	CAR-CAR	8,7	4,5	sem	nao
22	083256-6	M	38	13	sim	AG	BEN-BEN	14	0,4	sem	sim
136	723422-2	F	21	3	nao	GG	CAR-CAR	7,7	6,5	sem	nao
142	125458-1	M	18	1	sim	AG	BEN-BEN	7,6		sem	nao
145	520947-3	M	48	8	nao	AG	BEN-CAR	6,45	4,5	sem	nao
148	749083-0	F	24	2	nao	GG	CAR-CAR	7,2	2,6	homo	nao
149	657519-4	F	43	5	nao	AG	CAR-CAR	9,9	2	hete	nao
150	500295-2	M	41	6	nao	GG	CAR-CAR	7,4	2,5	sem	nao
151	761197-7	F	22	1	nao	GG	BEN-CAR	7,2	4,3	sem	sim
152	714228-3	M	23	3	nao	GG	CAR-CAR	9,5	9,3	hete	nao
153	688405-8	F	26	1	nao	AG	CAR-CAR	11	2,4	sem	nao

Homo: Homogigoto Hete: Heterozigoto Sem: não portador de alfa Talassemia.

Anexo 4

Protocolos

1. Gene Beta Globina

Acesso Gene Bank: 455025

Pesquisa: Sequenciamento Região promotora e Exons 1,2 e3

Beta-1F: 5'-GCATAT TCTGGAGACGCAGGAAG-3'
(61708-61730)

Beta-1R: 5'-CCACACTGATGCAATCAT TCG TC-3'
(62738-61760)

PCR: Prms (0.1uM), dNTPs (0.1uM), MgCl₂(2mM),
Taq(0.2U/ul), Tris-KCl (0.8x/40mM), H₂O (qsp 50ul)
[94°C-3min / {94°C-45s, 60°C-30s, 72°-1min}35x/72°C-7min]

Beta-3F: 5'-GGT TGG GAT AAG GCT GGA TTA TTC-3'

Beta-3R: 5'-TGT TGC CAA TGT GCA TTA GCT G-3'

PCR: Prms (0.1uM), dNTPs(0.1uM), MgCl₂(2mM)
Taq(0.2U/ul), Tris-KCl (0.8x/40mM), H₂O (qsp 50ul)
[94°C-3min / {94°C-40s, 60°C-30s, 72°-1min}35x/72°C 7min]

2. ICAM1

Acesso Gene Bank: X59288

Pesquisa de SNPs: G241R (G657A) e E469K (G1548A).

Método: CSGE gel a 10%, coloração com BrEt

IC241F: 5'-GCTCACACCTTTCTCTCTCCC-3' (549-569)

IC241R: 5'-TCGTTGCCATAGGTGACTGTG-3' (719-739)

IC469F: 5'-TCAAGTGTCTAAAGGATGGCAC-3' (1429-1450)

IC469R: 5'-GGT GAG GAT TGC ATT AGG TCC-3' (1613-1633)

PCR IC241 e IC469:

Prms (0.1uM), dNTPs(0.1uM), Taq (0.2U/ul), MgCl₂(2mM),
Tris-KCl (0.8x/40mM), H₂O(qsp 50ul)

[94°C-3min / {94°C 40s, 58°C 30s, 72° 1min}35x/72°C 7min]

3. Gene PSGL-1

Acesso Gene Bank: U25956

Pesquisa VNTR no exon 2

Método: PCR

PSGL1-F:5'-CCT GTC CAC GGA TTC AGC- 3' (576-593)

PSGL1-R: 5'-GGG AAT GCC CTT GTG AGT AA-3' (1134-1115)

PCR: Prm (0.2uM), dNTPs (0.2mM), MgCl₂ (2mM), Tris-KCl
(0.8x/40mM), Taq (0.03U/ul), H₂O (qsp25ul)

[94°C-3min / {94°C 30s, 57°C 30s, 72° 1min}35x/72°C 7min]

Deteção: eletroforese gel acrilamida 7.0% e corado EtBr

Alelo A=558 pb, Alelo B=528 pb, Alelo C=498 pb

4. Gene MPO

Acesso Gene Bank: X15377

Pesquisa de SNPs: G-463A

Método: CSGE- gel 10% , coloração BrEt

MPO-F: 5'-CGGTATAGGCACACAATGGTGAG-3' (1922-1944)

MPO-R: 5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC-3' (2266-2245)

PCR: Prm (0.24uM), Tris-HCl(50mM pH9), (NH₄)₂SO₄
(20mM), dNTPs (37,5uM), MgCl₂ (1,5mM), Taq (0.05U/ul)

6. Gene CD18 (ITGB2)

Acesso Gene Bank: NT 011515 –gene (1617018-1644058)

Pesquisa de SNPs: V441V- C1323T

Método: RFLP enz: MboII (8/7) – GAAGA minus

CD18 R: 5'-GAGAAAGTGACCCACTCAAGGC-3' (21539-21561)

CD18 F: 5'-CTGCGTGTACATGTCTCTG-3' (20742-20762)

PCR: Prms (0.1uM), dNTPs (100uM), MgCl₂ (2mM), Tris-
KCl (0.8x/40uM), Taq (0.02U/ul), H₂O (qsp50ul).

[94°C 3' / {94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1' }35x / 72°C 5']

Digestão: PCR (8ul), 4U MBO, Tampão 1x

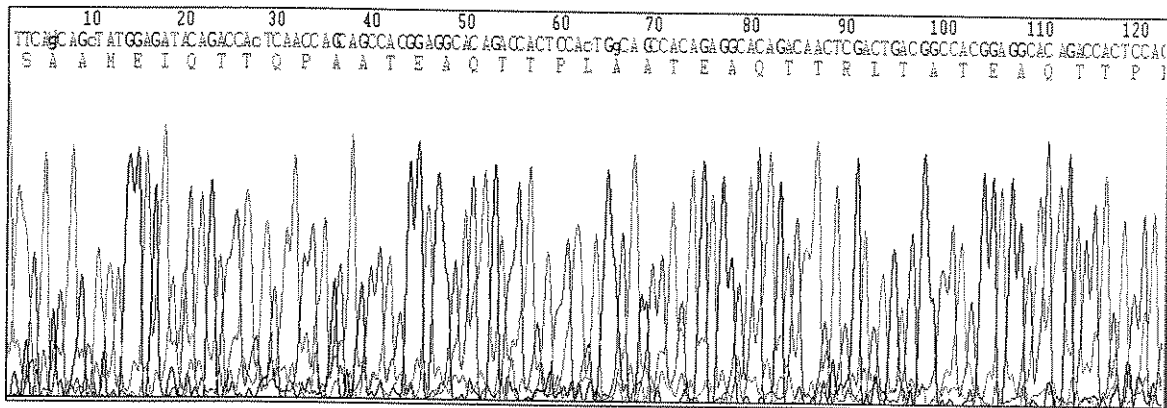
Genótipos: CC 113-707 pb; TT 113-237-470 pb

CT 113-237-470-707 pb.

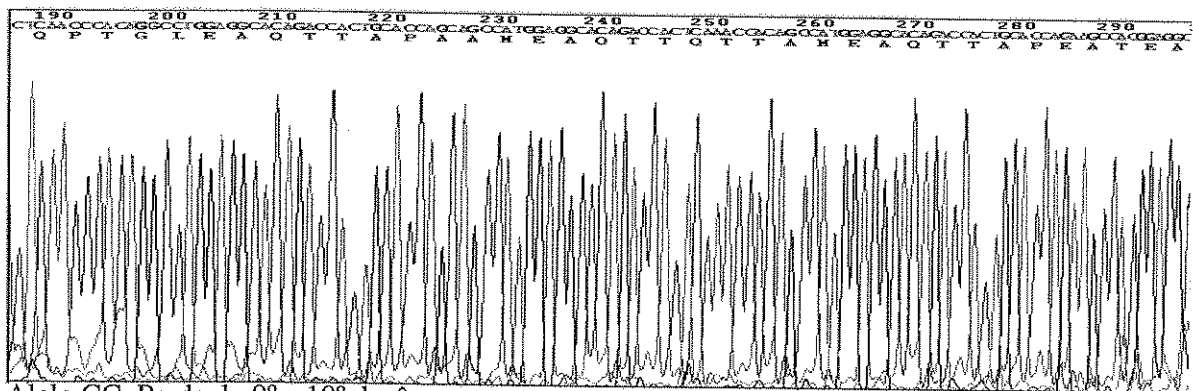
Deteção: eletroforese: gel agarose 2.0%, marcação com EtBr.

Anexo 5

Cromatogramas das seqüências dos alelos BB (deleção do 2º decâmero) e CC (deleção dos decâmeros 9º e 10º) do VNTR gene *PSGL-1*.



Alelo BB. Perda do 2º decâmero. No início do 3º decâmero há uma troca do aminoácido A por P.

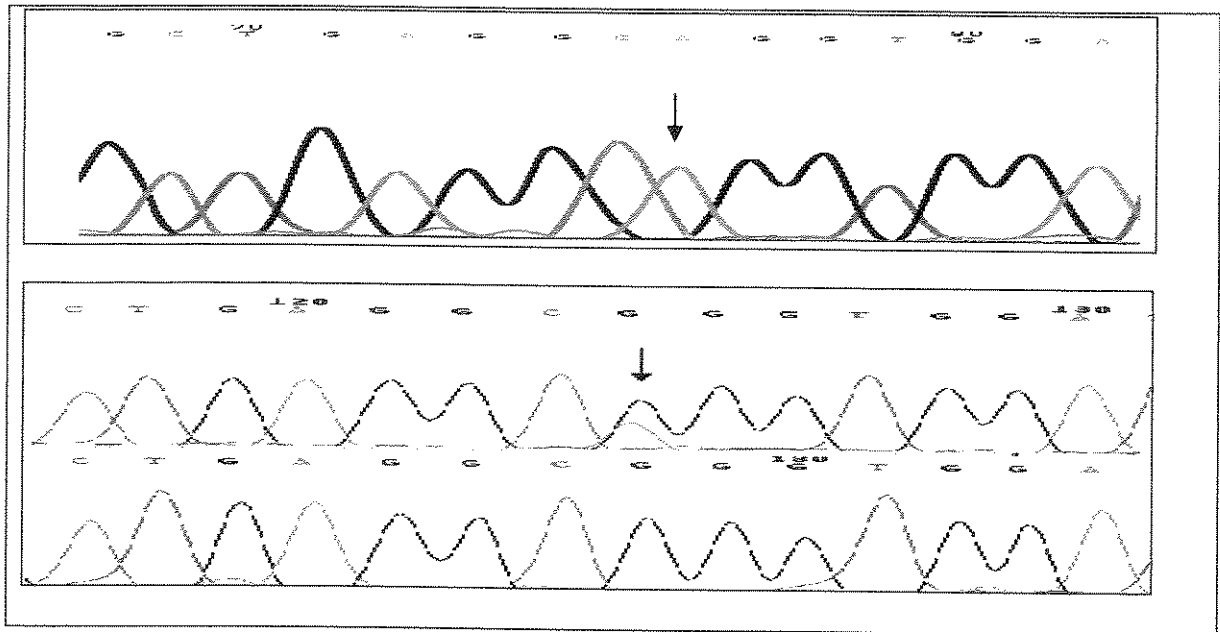


Alelo CC. Perda do 9º e 10º decâmeros.

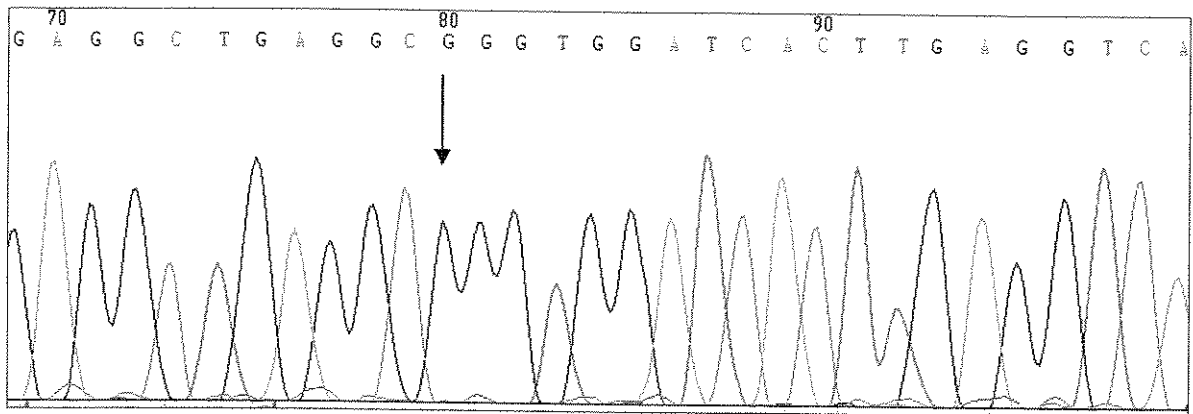
Tradução="MPLQLLLLLLLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQAT
EYEYLDYDFLPETEPPPEMLRNSD T T P L T G P G T P E S T T V E P A A R R S T G L D A G G A V T E
L T T E L A N M G N L S T D S A A M E I Q T T Q P A A T E A Q T T Q P V P T E A Q T T P L A A T E A Q T T R
L T A T E A Q T T P L A A T E A Q T T P P A A T E A Q T T Q P T G L E A Q T T A P A A M E A Q T T A P A A
M E A Q T T P P A A M E A Q T T Q T T A M E A Q T T A P E A T E A Q T T Q P T A T E A Q T T P L A A M E A
L S T E P S A T E A L S M E P T T K R G L F I P F S V S S V T H K G I P M A A S N L S V N Y P V G A P D H I S V K
Q C L L A I L I L A L V A T I F F V C T V V L A V R L S R K G H M Y P V R N Y S P T E M V C I S S L L P D G G E G
P S A T A N G G L S K A K S P G L T P E P R E D R E G D D L T L H S F L P"

(em negrito 1º ao 15º decâmero)

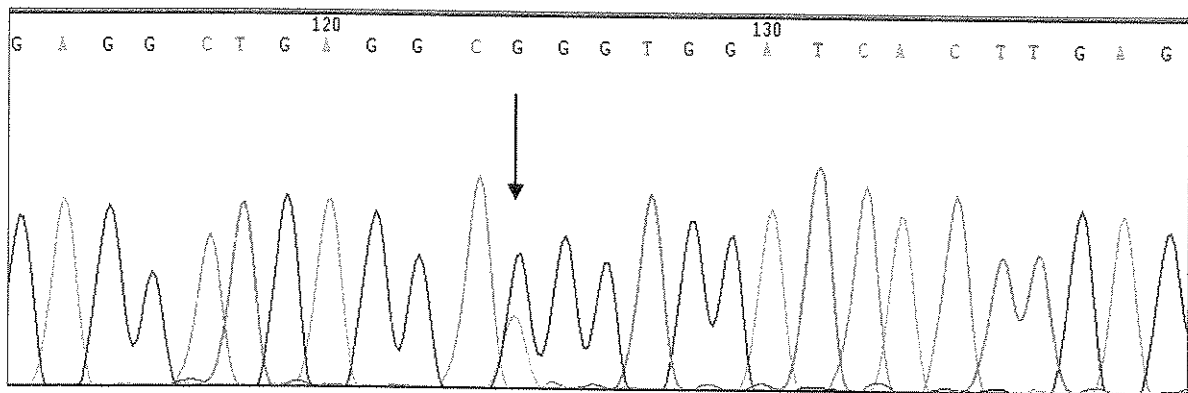
Cromatograma homozigoto A-463A gene *MPO*



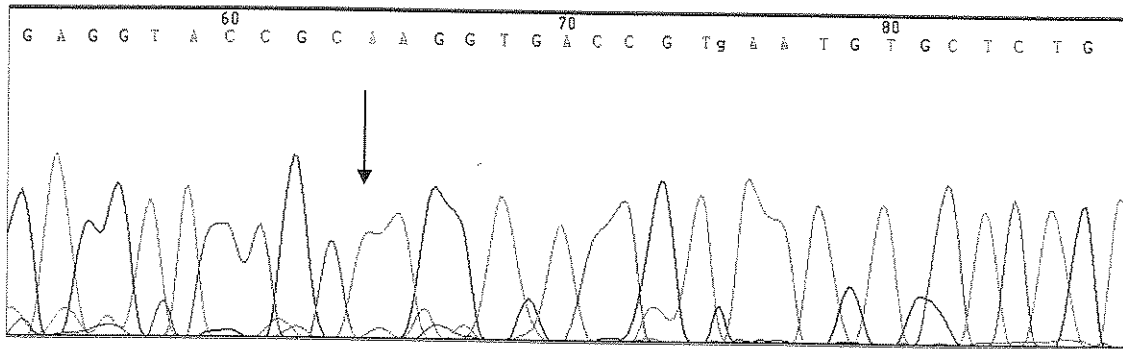
Cromatograma do homozigoto G-463G gene *MPO*



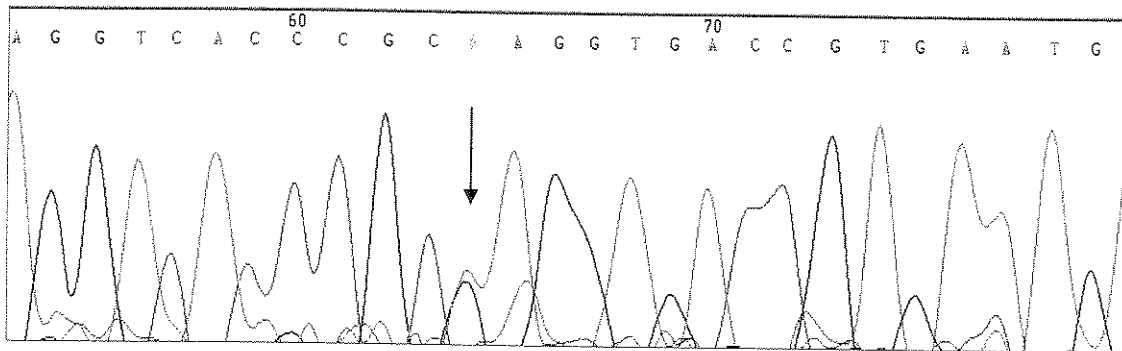
Cromatograma heterozigoto A-463G do gene *MPO*



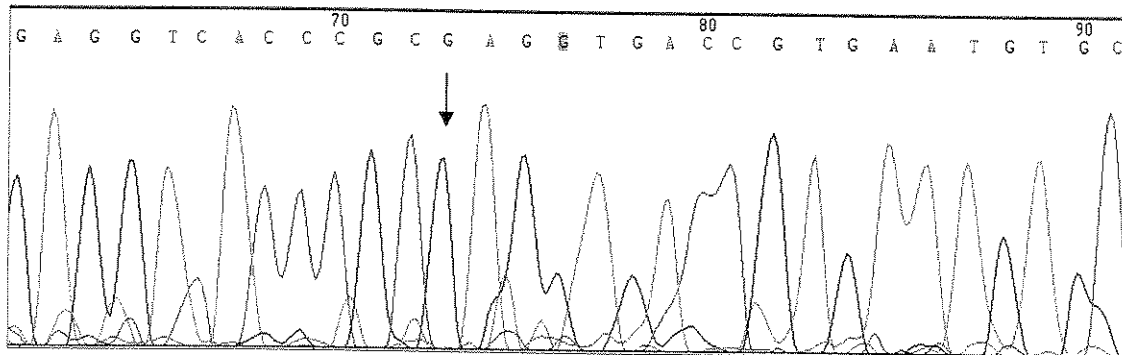
Cromatograma homozigoto A469A do gene *ICAM-1*



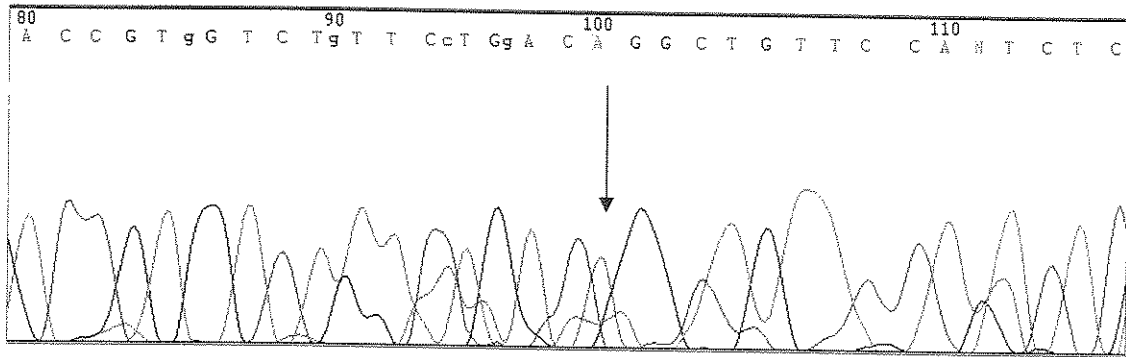
Cromatograma do heterozigoto A469G gene *ICAM-1*



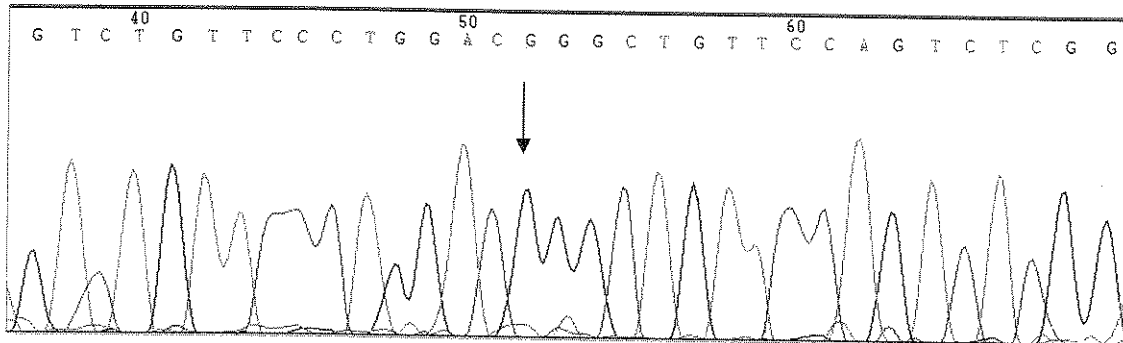
Cromatograma do homozigoto G469G do gene *ICAM-1*



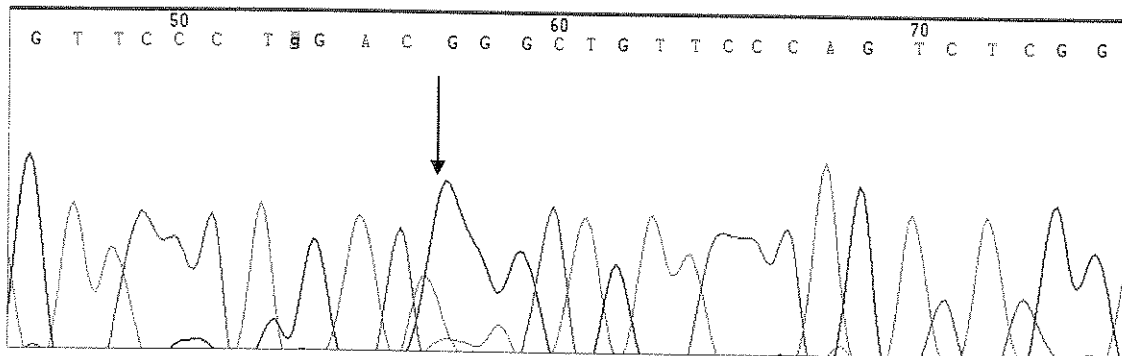
Cromatograma do homozigoto A657A (R241R) do gene *ICAM-1*



Cromatograma do homozigoto G657G (G241G) do gene *ICAM-1*.



Cromatograma do heterozigoto G657A (G241R) do gene *ICAM-1*.



Anexo 3

INTERNAMENTOS POR INFECÇÃO
[Nº-Genótipo. Nome (Período de acompanhamento)]

54-AG. IMS (91-03) (98) PNM (89,94,95,96,97,99,99,00) CF+F (96) PNM +derrame Pleural	(00) Abscesso Dentário (02) CF+F (03) Artrite Séptica	(97) CF+F (99) PNM
116-GG. EMSS (96-03) (98,98) CF+F (98,98) ITU (98) PNM+Derrame Pleural (99) PNM (99) ITU (99) Pielonefrite (02) PNM	6-GG. FSM (90-03) (90) PNM (92) PNM	89-AG. CL (90-03) Falta o Prontuário VOL.I (01) PNM (01) PNM (02) Celulite
124-AA. HFS (99-00) (99,00,00) CF+F (99) F+ SD osteomielite (00) CF+F sinusite (01) PNM	112-AG. AFS (98-03) (98) TB	106-AG. IS (97-03) (97) PNM lobar (01) CF+F
31-AG. MJR (97-03) (93,97,97,97) CF+F (97) PNM + Choque Séptico	100-AG. JVS (96-00) (94) TB (98) TB	79-AG. MSC (92-03) (93) Abscesso Dentário (95) CF+F (97) PNM (01) PNM
93-GG. MAM (92-03) (93) PNM+Ins.Respiratória (93) Colangite (95) CF+GECA (96) PNM	81-GG. CB (89-01) (92,92,92) CF+F, ITU, CF+F (96,96) PNM,PNM (98) Úlcera Infectada (99) Endocardite (01) Choque Séptico	53-AG. FJP (96-03) (98) PNM
5-AG. DC (90-03) ()... (03,03) Osteomielite, CF+F	56-GG. AMLO (93-03) (89,90,95,96,97,99) CF+F (90) CF + sinusite	75-GG. MAM (90-99) (85,94) CF+F (97) Pielonefrite
98-AG. SAA (94-00) (94) Pielonefrite (95) Peritonite (95) PNM (96) Celulite (97) CF+F Sinusite (97) Celulite + Osteomielite (98) Peritonite (98) Diarréia Crônica (99) Derrame Pleural (00) PNM	83-AG. DS (95-03) (95) CF+F SD PNM (96) PNM (98) PNM (98) CF+F (01) CF+F	57-GG. AUS (92-03) (98) PNM lobar (99) CF+F
8-GG. MFS (90-03) (92) CF+F (96) Celulite	9-AG. SAF (90-03) (89) Úlcera Infectada (96) Osteomielite (89,90) CF+F	36-GG. MISA (92-03) (95) PNM (97) PNM
71-AA. AFS (93-03) (95,95,95) CF+F, ITU, CF+F sinusite (98) ITU	59-AG. JPA (92-03) Falta o prontuário VOL.I (90) Úlcera Infectada (01) Celulite em Olho Direito (02) CF+F	19-GG. AAN (90-03) (87) CF+F (91) PNM
	22-AG. JE (90-03) (83) Úlcera Infectada (90) Celulite	86-GG. EBM (91-01) (93,99) CF+F
	142-AG. JCR (90-03) (85) PNM	24-AG. DAL (90-96) (76) PNM+Derrame Pleural (76) Piodermite (82) Osteomielite (85) NACF (86) CF+F (89) osteomielite Ombro Esq. (93) PNM
	35-AG. RCL (91-00) (94) PNM (95) ITU+Colpíte	2-AG. RPS (90-03) (99) CF+F

REFERÊNCIAS

1. Junior, D.F.T., et al., *Doença Falciforme*, in *Coordenadoria de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde do Brasil*. 1990.
2. Zago, M.A., *Anemia Falciforme*, in *Hematologia Fundamentos e Prática*. 2001, Atheneu: São Paulo. p. 290-307.
3. Platt, O.S., et al., *Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death*. N Engl J Med, 1994. **330**(23): p. 1639-44.
4. Powars, D.R., *Natural history of sickle cell disease--the first ten years*. Semin Hematol, 1975. **12**(3): p. 267-85.
5. de Montalembert, M., et al., *Cerebrovascular accidents in sickle cell disease. Risk factors and blood transfusion influence. French Study Group on Sickle Cell Disease*. Eur J Pediatr, 1993. **152**(3): p. 201-4.
6. Ohene-Frempong, K., et al., *Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors*. Blood, 1998. **91**(1): p. 288-94.
7. Tang, D.C., et al., *Polymorphisms within the angiotensinogen gene (GT-repeat) and the risk of stroke in pediatric patients with sickle cell disease: a case-control study*. Am J Hematol, 2001. **68**(3): p. 164-9.
8. Kinney, T.R., et al., *Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. Pediatrics, 1999. **103**(3): p. 640-5.
9. Pegelow, C.H., et al., *Silent infarcts in children with sickle cell anemia and abnormal cerebral artery velocity*. Arch Neurol, 2001. **58**(12): p. 2017-21.
10. Balkaran, B., et al., *Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease*. J Pediatr, 1992. **120**(3): p. 360-6.
11. Wierenga, K.J., B.E. Serjeant, and G.R. Serjeant, *Cerebrovascular complications and parvovirus infection in homozygous sickle cell disease*. J Pediatr, 2001. **139**(3): p. 438-42.
12. Orkin, S.H., et al., *Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster*. Nature, 1982. **296**(5858): p. 627-31.
13. Antonarakis, S.E., et al., *Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the beta-globin gene cluster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(1): p. 137-41.
14. Pagnier, J., et al., *Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(6): p. 1771-3.
15. Lapoumeroulie, C., et al., *A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type*. Hum Genet, 1992. **89**(3): p. 333-7.
16. Nagel, R.L., et al., *The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between G gamma and HbF level*. Blood, 1987. **69**(4): p. 1026-30.
17. Kulozik, A.E., et al., *Fetal hemoglobin levels and beta (s) globin haplotypes in an Indian populations with sickle cell disease*. Blood, 1987. **69**(6): p. 1742-6.
18. Kutlar, A., et al., *Hematological observations on Arabian SS patients with a homozygosity or heterozygosity for a beta S chromosome with haplotype #31*. Hemoglobin, 1985. **9**(6): p. 545-57.
19. Wainscoat, J.S., et al., *A genetic marker for elevated levels of haemoglobin F in homozygous sickle cell disease?* Br J Haematol, 1985. **60**(2): p. 261-8.

20. Nagel, R.L., et al., *The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients.* Blood, 1991. **77**(6): p. 1371-5.
21. Rieder, R.F., et al., *Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia.* Am J Hematol, 1991. **36**(3): p. 184-9.
22. Miyoshi, K., et al., *X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome.* Blood, 1988. **72**(6): p. 1854-60.
23. Steinberg, M.H., et al., *Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia.* Am J Hematol, 1995. **48**(3): p. 175-81.
24. Dover, G.J., et al., *Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2.* Blood, 1992. **80**(3): p. 816-24.
25. Chang, Y.C., et al., *An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age.* Blood, 1995. **85**(4): p. 1111-7.
26. Steinberg, M.H., *Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia.* Hemoglobin, 2001. **25**(2): p. 195-211.
27. Thein, S.L., et al., *Detection of a major gene for heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin after accounting for genetic modifiers.* Am J Hum Genet, 1994. **54**(2): p. 214-28.
28. Nagel, R.L. and M.H. Steinberg, *Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia.* Pediatr Pathol Mol Med, 2001. **20**(2): p. 123-36.
29. Lopez, J.A., E.H. Ludwig, and B.J. McCarthy, *Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications.* J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 10055-61.
30. Afshar-Kharghan, V. et al., *Human polymorphism of P-selectin glycoprotein ligand 1 attributable to variable numbers of tandem decameric repeats in the mucinlike region.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3306-7.
31. Veldman, G.M., et al., *Genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding human P-selectin glycoprotein ligand.* J Biol Chem, 1995. **270**(27): p. 16470-5.
32. Lozano, M.L., et al., *Polymorphisms of P-selectin glycoprotein ligand-1 are associated with neutrophil-platelet adhesion and with ischaemic cerebrovascular disease.* Br J Haematol, 2001. **115**(4): p. 969-76.
33. Koch, W., et al., *Association of a CD18 gene polymorphism with a reduced risk of restenosis after coronary stenting.* Am J Cardiol, 2001. **88**(10): p. 1120-4.
34. Zee, R.Y., D. Bates, and P.M. Ridker, *A prospective evaluation of the CD14 and CD18 gene polymorphisms and risk of stroke.* Stroke, 2002. **33**(4): p. 892-5.
35. Vora, D.K., et al., *Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster.* Genomics, 1994. **21**(3): p. 473-7.
36. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase.* Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 383-9.

37. Austin, G.E., et al., *Sequence comparison of putative regulatory DNA of the 5' flanking region of the myeloperoxidase gene in normal and leukemic bone marrow cells*. *Leukemia*, 1993. **7**(9): p. 1445-50.
38. Piedrafita, F.J., et al., *An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(24): p. 14412-20.
39. Vanderson Rocha, R.F.F., R. Porcher, H. Bittencourt, A. Latouche, A. Devergie, H. Esperou, P. Ribaud, G. Socie, M.A. Zago, Eliane Gluckman. Stem Cell transplant Unit, Hopital Saint Louis, Paris, France, Metropolitan; Cellular Therapy Center, Hemocentro, Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. *Influence of Myeloperoxidase Gene Polymorphism on Incidence of Severe Bacterial Infections after HLA Identical Bone Marrow Transplantation for Patients with Leukemia*. 2000.
40. Korkko, J., et al., *Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1681-5.
41. Verity, D.H., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behcet's disease*. *Eur J Immunogenet*, 2000. **27**(2): p. 73-6.
42. Yang, H., *Analysis of ICAM-1 gene polymorphism in immunologic subsets of inflammatory bowel disease*. *Exp Clin Immunogenet*, 1997. **14**(3): p. 214-25.
43. Ridker, P.M., *Intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and the risks of developing atherosclerotic disease*. *Eur Heart J*, 1998. **19**(8): p. 1119-21.
44. Amoli, M.M., et al., *Polymorphism at codon 469 of the intercellular adhesion molecule-1 locus is associated with protection against severe gastrointestinal complications in Henoch-Schonlein purpura*. *J Rheumatol*, 2001. **28**(5): p. 1014-8.
45. Boiardi, L., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behcet's Disease*. *J Rheumatol*, 2001. **28**(6): p. 1283-7.
46. Salvarani, C., et al., *Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis: association with disease risk and severity*. *J Rheumatol*, 2000. **27**(5): p. 1215-21.
47. Taylor, J.G.t., et al., *Variants in the VCAMI gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease*. *Blood*, 2002. **100**(13): p. 4303-9.