

***LAUDICÉIA RODRIGUES DE SOUZA***

**AÇÃO DE CITOCINAS NA HEMATOPOIESE  
EM PACIENTES COM DOENÇAS FALCIFORMES**

***CAMPINAS***

***2006***

***LAUDICÉIA RODRIGUES DE SOUZA***

**AÇÃO DE CITOCINAS NA HEMATOPOIESE  
EM PACIENTES COM DOENÇAS FALCIFORMES**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências  
Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.*

***ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. HELENA ZERLOTTI WOLF GROTT***

***CAMPINAS***

***2006***

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So89a      Souza, Laudicéia Rodrigues de  
              Ação de citocinas na hematopoiese em pacientes com doenças  
              falciformes / Laudicéia Rodrigues de Souza. Campinas, SP : [s.n.],  
              2006.

Orientador : Helena Zerlotti Wolf Grotto  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Interleucina 3 . 2. Neopterina. 3. Interferon gama. 4.  
Anemia falciforme. I. Grotto, Helena Zerlotti Wolf. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

**Título em inglês: Cytokines action on hematopoiesis in sickle cell disease patients**

**Keywords:** • Interleucina 3  
                  • Neopterina  
                  • Interferon gama  
                  • Anemia falciforme

**Área de concentração : Ciências Biomédicas**

**Titulação: Mestrado em Ciências Médicas**

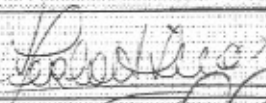
**Banca examinadora: Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto  
                              Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro  
                              Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**

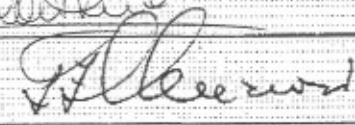
**Data da defesa: 15-12- 2006**

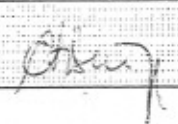
# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Helena Zerlotti Wolf Grotto**

## Membros:

1. **Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto** - 

2. **Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro** - 

3. **Profa. Dra. Carmen Silva Bertuzzo** - 

4. **Maria Stella Figueiredo**

**Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 15/12/2006**

## ***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais Aguielo e Nilcéia que me fizeram ver que os obstáculos são transponíveis quando se acredita, aos meus irmãos Paulo e Cristiane e ao meu namorado Toca pelo incentivo.*

### ***AGRADECIMENTO ESPECIAL***

*À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Zerlotti Wolf Grotto pelo incentivo, paciência e dedicação na orientação deste trabalho.*

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia Clínica, especialmente aos do setor de Hematologia, pelo apoio, amizade e colaboração.

À FAPESP - (nº 13801/7) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Ronei Mamoni por dividir comigo seus conhecimentos em algumas técnicas utilizadas neste trabalho com dedicação e paciência.

Aos amigos e companheiros do curso de pós-graduação por tornarem esta etapa da minha vida muito mais agradável e prazerosa.

À todos que direta ou indiretamente compartilharam comigo seus conhecimentos e experiências, desvendando dúvidas na busca do saber, para a concretização desta investigação.

|                                                                                                 | <b>PÁG.</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                              | <i>xiii</i> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                            | <i>xv</i>   |
| <b>1- INTRODUÇÃO.....</b>                                                                       | <b>17</b>   |
| <b>1.1- Considerações gerais.....</b>                                                           | <b>18</b>   |
| <b>1.2- O processo inflamatório na fisiopatologia da Doença Falciforme....</b>                  | <b>22</b>   |
| <b>1.3- Citocinas, hematopoiese e metabolismo do ferro.....</b>                                 | <b>24</b>   |
| <b>1.4- NP e eritropoiese.....</b>                                                              | <b>29</b>   |
| <b>1.5- Receptor da Tf como indicador do grau da eritropoiese.....</b>                          | <b>30</b>   |
| <b>2- OBJETIVOS.....</b>                                                                        | <b>33</b>   |
| <b>3- CASUÍSTICA.....</b>                                                                       | <b>35</b>   |
| <b>4- MÉTODOS.....</b>                                                                          | <b>37</b>   |
| <b>4.1- Diagnóstico das hemoglobinopatias.....</b>                                              | <b>38</b>   |
| <b>4.2- Avaliação do metabolismo do ferro.....</b>                                              | <b>38</b>   |
| <b>4.3- Avaliação do processo inflamatório.....</b>                                             | <b>38</b>   |
| <b>4.4- Avaliação da atividade eritropoiética.....</b>                                          | <b>39</b>   |
| <b>4.5- Avaliação do processo hemolítico.....</b>                                               | <b>39</b>   |
| <b>4.6- Métodos estatísticos.....</b>                                                           | <b>39</b>   |
| <b>5- RESULTADOS.....</b>                                                                       | <b>40</b>   |
| <b>5.1- Perfil hematológico dos grupos estudados.....</b>                                       | <b>41</b>   |
| <b>5.2- Avaliação da participação de fatores inflamatórios na atividade eritropoiética.....</b> | <b>44</b>   |

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6- DISCUSSÃO.....</b>                                        | <b>57</b> |
| <b>7- CONCLUSÕES.....</b>                                       | <b>64</b> |
| <b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                       | <b>66</b> |
| <b>9- ANEXOS.....</b>                                           | <b>75</b> |
| <b>Anexo 1-</b> Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 76        |
| <b>Anexo 2-</b> Trabalho publicado.....                         | 77        |

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

|        |                                                    |
|--------|----------------------------------------------------|
| ADC    | Anemia de doença crônica                           |
| BI     | Bilirrubina indireta                               |
| BT     | Bilirrubina total                                  |
| CMH    | Complexo maior de histocompatibilidade             |
| CVO    | Crise vaso-oclusiva                                |
| CSF    | Fator estimulante de colônia                       |
| EPO    | Eritropoietina                                     |
| ET-1   | Endotelina 1                                       |
| Fe     | Ferro                                              |
| FS     | Ferritina sérica                                   |
| GTP    | guanosino trifosfato                               |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônia granulócito/macrófago |
| G-CSF  | Fator estimulante de colônia de granulócitos       |
| Hb     | Hemoglobina                                        |
| Hb S   | Hemoglobina S                                      |
| Hb SS  | Anemia falciforme                                  |
| Hb C   | Hemoglobina C                                      |
| Hb SC  | Hemoglobinopatia SC                                |
| Hb F   | Hemoglobina Fetal                                  |
| HHbF   | HbF>8.5%                                           |
| HPLC   | “Hight-performance liquid chromatography”          |
| IRE    | Elemento responsivo ao Ferro                       |

|               |                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| IRP           | Proteína reguladora do Ferro                        |
| ICAM-1        | Molécula de adesão intercelular-1                   |
| IL-3          | Interleucina 3                                      |
| IL-7          | Interleucina 7                                      |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gama                                     |
| Kda           | Kilo dalton                                         |
| LVF           | HbF < 8.5%                                          |
| LT            | Linfotoxina                                         |
| LDL           | Lipídeo de baixa densidade                          |
| M-CSF         | Fator estimulante de colônia monócito/macrófago     |
| NK            | Célula “Natural killer”                             |
| NO            | Óxido nítrico                                       |
| NP            | Neopterina                                          |
| Rtc           | Reticulócitos                                       |
| SCF           | Fator estimulante de “stem cell”                    |
| sTfR          | Receptor solúvel de transferrina                    |
| TfR           | Receptor de transferrina                            |
| TGF $\beta$   | Fator de crescimento em transformação $\beta$       |
| Th0           | Linfócito T helper 0                                |
| Th1           | Linfócito T helper 1                                |
| TIBC          | Capacidade total de ligação do ferro à transferrina |
| TNF           | Fator de necrose tumoral                            |
| Tf            | Transferrina                                        |
| VCAM-1        | Molécula de adesão vascular                         |

## ***LISTA DE TABELAS***

---

|                                                                                                              | <b><i>PÁG.</i></b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Tabela 1-</b> Valores hematimétricos e do estado do Fe nos grupos controle, SC e SS.....                  | 43                 |
| <b>Tabela 2-</b> Valores de IL-3, IFN- $\gamma$ e NP nos grupos estudados.....                               | 44                 |
| <b>Tabela 3-</b> Comparação dos parâmetros laboratoriais entre os grupos com Hb F > 8,5% e Hb F < 8,5%.....  | 54                 |
| <b>Tabela 4-</b> Correlação entre as variáveis avaliadas nos grupos controle e de pacientes.....             | 55                 |
| <b>Tabela 5-</b> Correlação entre as variáveis nos grupos de pacientes SS com Hb F > 8.5% e Hb F < 8.5%..... | 56                 |

### **Nos anexos:**

|                                                                                                                                           | <b><i>PÁG.</i></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Tabela 1-</b> Hematological and iron status parameters in SS and SC patient groups and control group (median and range).....           | 80                 |
| <b>Tabela 2-</b> Cytokines and NP levels in control and patient groups (median and range).....                                            | 80                 |
| <b>Tabela 3-</b> Hb, sTfR, IL-3, INF- $\gamma$ and NP levels in SS patient subgroups according to Hb F percentage (median and range)..... | 80                 |
| <b>Tabela 4-</b> Valores de referência do grupo de controles normais.....                                                                 | 83                 |
| <b>Tabela 5-</b> Valores encontrados nas análises dos pacientes SC.....                                                                   | 85                 |
| <b>Tabela 6-</b> Valores encontrados nas análises dos pacientes SS.....                                                                   | 86                 |

|                                                                                                                                                   | <b>PÁG.</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Figura 1-</b> Locais de síntese das cadeias globínicas no embrião, no feto e no adulto.....                                                    | 18          |
| <b>Figura 2-</b> Fenômeno da vaso-oclusão na anemia falciforme.....                                                                               | 20          |
| <b>Figura 3-</b> Estrutura da NP.....                                                                                                             | 26          |
| <b>Figura 4-</b> Esquema mostrando a possível interação entre a eritropoiese, processo inflamatório crônico e distúrbio de metabolismo do Fe..... | 32          |
| <b>Figura 5-</b> Boxplots referentes às dosagens de Hb F nos grupos C, SC e SS.....                                                               | 45          |
| <b>Figura 6-</b> Boxplots referentes às dosagens de Fe nos grupos C, SC e SS....                                                                  | 46          |
| <b>Figura 7-</b> Boxplots referentes às dosagens de TIBC nos grupos C, SC e SS.....                                                               | 47          |
| <b>Figura 8-</b> Boxplots referentes às dosagens de FS nos grupos C, SC e SS....                                                                  | 48          |
| <b>Figura 9-</b> Boxplots referentes às dosagens de EPO nos grupos C, SC e SS.....                                                                | 49          |
| <b>Figura 10-</b> Boxplots referentes às dosagens de sTfR nos grupos C, SC e SS.....                                                              | 50          |
| <b>Figura 11-</b> Boxplots referentes às dosagens de IFN- $\gamma$ nos grupos C, SC e SS.....                                                     | 51          |
| <b>Figura 12-</b> Boxplots referentes às dosagens de NP nos grupos C, SC e SS....                                                                 | 52          |
| <b>Figura 13-</b> Boxplots referentes às dosagens de IL-3 nos grupos C, SC e SS.....                                                              | 53          |

## *RESUMO*

O papel da inflamação na fisiopatologia da anemia falciforme tem sido alvo de recentes investigações. O processo obstrutivo que ocorre na microcirculação, causado pelo acúmulo de células falcizadas, leva à lesão do endotélio, com migração e adesão de leucócitos, liberação de radicais oxigênio, liberação e ativação de citocinas inflamatórias. É reconhecida a participação de diversas citocinas na eritropoiese, estimulando ou inibindo a produção de células eritróides pela medula óssea, em especial na anemia que acompanha as doenças inflamatórias/infecciosas crônicas. É reconhecida a ação inibitória do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) sobre as células progenitoras da medula óssea, além de sua participação nos distúrbios do metabolismo do ferro (Fe), presentes na anemia de doença crônica. A Neopterina (NP) é um marcador associado à imunidade celular produzido pelos monócitos/macrófagos quando estimulados pelo IFN- $\gamma$ . Os dados sobre a participação do IFN- $\gamma$  no processo inflamatório que acompanha a Doença Falciforme são contraditórios e se restringem à Anemia Falciforme (Hb SS). O objetivo deste trabalho foi estudar a participação da Interleucina-3 (IL-3), do IFN - $\gamma$  e da NP em pacientes com Hb SS e hemoglobinopatia SC (Hb SC) na fase estável da doença, a fim de verificar a possível ação dessas citocinas e da NP sobre o metabolismo do Fe e da hematopoiese. Nossos resultados mostraram que as concentrações de IL-3 foram mais altas nos grupos SS e SC em relação ao controle, enquanto as determinações de IFN- $\gamma$  não mostraram diferenças entre os grupos. Pacientes SS com hemoglobina Fetal (Hb F) > 8,5% mostraram valores de IL-3 significativamente mais elevados do que aqueles com Hb F < 8,5% ( $p= 0,0338$ ). Não foi observada correlação entre os parâmetros inflamatórios e do metabolismo do Fe. Uma correlação direta foi observada somente nos pacientes SS entre os níveis de IL-3 e hemoglobina (Hb) ( $r= 0,4633$ ,  $p= 0,0457$ ), IL-3 e Hb F ( $r= 0,6011$ ,  $p= 0,0065$ ).

Os níveis de NP foram significativamente mais elevados nos pacientes SS e SC do que nos controles, mas não houve diferença entre os 2 grupos de pacientes. Não houve correlação entre NP e os parâmetros relacionados ao metabolismo de Fe. Esses dados sugerem que a IL-3 tem ação estimulante sobre a produção de Hb F e que pacientes com Hb SS, mesmo na fase estável da doença apresentam um certo grau de ativação do sistema monócito/macrófago, representado pelos altos níveis de NP, o que provavelmente contribui para a condição inflamatória crônica desses pacientes.

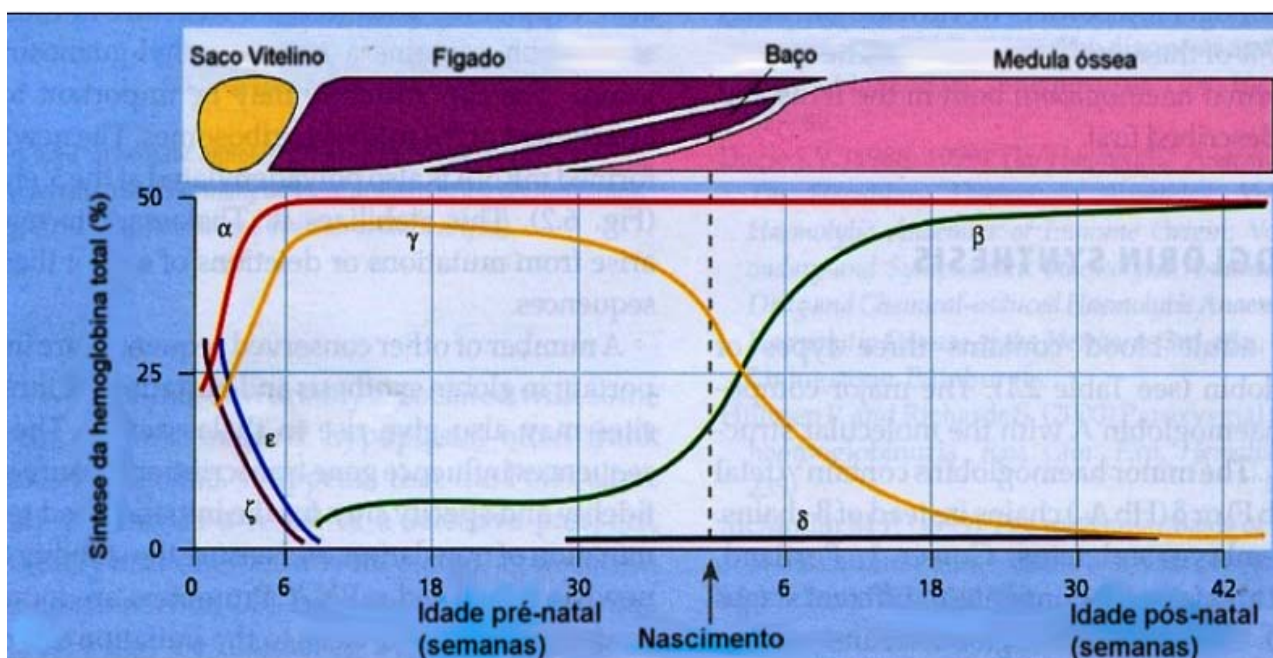
*ABSTRACT*

Sickle cell disease (SCD) has been recognized as a chronic inflammatory condition. Cytokines are released in response to stress or pathological situations and have influence on hematopoiesis. The aim of this study was to evaluate Interleukin-3 (IL-3), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and neopterin (NP) levels in steady state patients with sickle cell anemia (SS) (n= 38) and SC hemoglobinopathy (n= 17), in order to verify the possible action of those cytokines and NP on iron metabolism and hematopoiesis. Serum IL-3 concentration was higher in SS and SC groups than in controls, whereas IFN- $\gamma$  determinations were not different among groups. SS patients presenting HbF  $\geq$  8.5% showed IL-3 levels significantly higher than those with HbF < 8.5% (p= 0.0167). No correlation was observed among inflammatory and iron metabolism parameters. It was observed a significant correlation between IL-3 and Hb levels (r= 0.4201, p= 0.0086) and a negative correlation between IL-3 and reticulocyte counting (r= - 0.4019, p= 0.0124) only in SS group. NP levels were significantly higher in SS group than in control (p< 0.0001), but not different between SSxSC and SCxControl. No correlation was observed between NP and iron metabolism parameters. In conclusion, it was confirmed that IL-3 stimulates hematopoiesis and that SS patients, even in steady-state, presenting macrophage/monocyte activation, represented by high levels of NP, that probably contributes to chronic inflammatory condition.

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- Considerações Gerais

A molécula de Hb é composta por dois pares de cadeias polipeptídicas, cada uma das cadeias dobrada de maneira que contenha um grupo heme ligado covalentemente a uma molécula de oxigênio. São as cadeias polipeptídicas que determinam o tipo de Hb a ser produzida e estas cadeias variam de acordo com os diferentes estágios de desenvolvimento intra-uterino. São elas: cadeias alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) e zeta ( $\zeta$ ). A Figura 1 mostra a evolução das cadeias de globina desde a concepção até o 42º mês de vida e os respectivos locais em que a hematopoiese acontece.



**Figura 1-** Locais de síntese das cadeias globínicas no embrião, no feto e no adulto. (Hoffbrand & Pettit 2001).

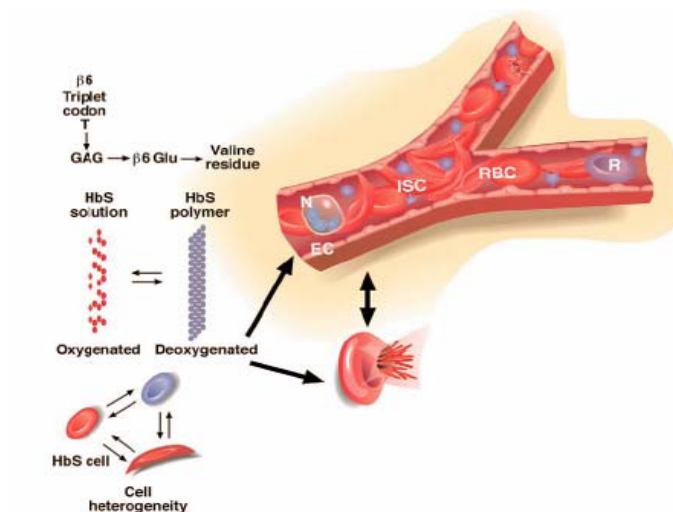
No período embrionário observamos a presença da Hb Gower I ( $\xi_2\varepsilon_2$ ) Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) e Hb Portland ( $\xi_2\gamma_2$ ). A Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ), é predominante no período fetal e é substituída após o nascimento pela HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Hoffbrand & Pettit, 1995).

A síntese das moléculas de Hb é um processo complexo e entre os erros que podem ocorrer durante esse processo, os mais comuns são conseqüentes à substituições de bases simples onde apenas um nucleotídeo (purina ou pirimidina) é trocado.

A Hb S é uma hemoglobina anômala resultante da troca de uma adenina por uma timina no códon 6 do gene da globina beta, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina. A Anemia Falciforme ocorre quando o indivíduo é homozigoto para a mutação, já as doenças falciformes ocorrem quando a Hb S está associada a outras hemoglobinopatias como Hb C, Hb D ou  $\beta$  talassemia (Beutler et al 2001).

O gene da hemoglobina S é um gene de alta frequência em todo o mundo, prevalecendo nas regiões onde há o predomínio de afros-descendentes. No Brasil é mais freqüente nas regiões sudeste e nordeste. Na África Equatorial, 40% da população é portadora, e a doença falciforme atinge uma prevalência de 2 a 3% da população. A Anemia Falciforme é a doença hereditária de maior prevalência no Brasil, chegando a acometer 0,1 a 0,3% da população negra. Devido ao alto grau de miscigenação na população brasileira, estudos têm demonstrado a crescente presença de hemoglobina S em indivíduos de cor branca (Ramalho 1986).

A Hb S é menos solúvel que a Hb normal, se polimeriza quando desoxigenada e, devido à sua rigidez, dificulta a deformabilidade do eritrócito e sua passagem por pequenos capilares e artérias, causando bloqueios vasculares, o que leva à infartos em vários órgãos. (Chies e Nardi, 2001). (Figura 2).



**Figura 2-** Fenômeno de vaso-oclusão na anemia falciforme. A troca de uma Adenina por uma Timina (A→T) leva à substituição do ácido glutâmico pela valina. Esta mutação faz com que a molécula de Hb S se polimerize quando desoxigenada. Os polímeros de Hb S lesam a membrana do citoesqueleto, tornando a hemácea falcizada. Nos vasos as células falcizadas interagem com o endotélio e outras células sanguíneas e causam a vaso-oclusão. Há ainda a hemólise intravascular que libera Hb no plasma levando ao sequestro de óxido nítrico e promovendo a vaso-constricção, entre outros problemas. Abreviações: EC: células endoteliais; ISC: células irreversivelmente falcizadas; N: neutrófilo; R: reticulócito; RBC: células vermelhas. (Steinberg 2006).

As células irreversivelmente falcizadas apresentam uma alta concentração de Hb, alto conteúdo de cálcio e pouco potássio, não retornando à forma original mesmo quando há um aumento da tensão de oxigênio (Beutler 2001).

A anemia falciforme é caracterizada clinicamente por períodos estáveis da doença e períodos de crise, que podem ser: crises vaso-oclusivas dolorosas, de seqüestração visceral e aplásticas.

A crise vaso-oclusiva (CVO) é a complicação mais freqüente na Hb SS levando a repetidas hospitalizações. Pode ser desencadeada por infecções, acidose, desidratação ou desoxigenação e os infartos podem ocorrer em diversos órgãos, como: ossos, pulmões, baço, rins, cérebro, entre outros. O balanço entre o estado estável e a crise é delicado e qualquer fator que altere o grau de ativação endotelial ou adesividade de células vermelhas tem o potencial de precipitar a CVO. (Chies & Nardi 2001, Hoffbrand & Petit 1995).

Um segundo defeito genético da Hb bastante freqüente resulta da substituição de um aminoácido (ácido glutâmico→lisina) no mesmo locus da cadeia beta globina que a Hb S, e que origina a Hb C, freqüente na população africana. A Hb C tende a formar cristais e os indivíduos homozigotos apresentam anemia hemolítica moderada, com formação de hemácias em alvo e microesferócitos. A associação da Hb S com a Hb C dá origem a hemoglobinopatia SC (Hb SC).

A hemoglobinopatia SC ocupa o segundo lugar dentre as síndromes falcêmicas mais freqüentes, perdendo apenas para a anemia falciforme. As manifestações clínicas da Hb SC são menos graves do que na Hb SS, a hemólise é menos intensa, porém estes indivíduos apresentam maior viscosidade sanguínea, o que leva às manifestações clínicas que caracterizam esta doença, como necrose asséptica da cabeça do fêmur, hemorragias na retina, episódios pulmonares agudos, hematúria, tendência à trombose e embolismo pulmonar, especialmente durante a gravidez (Hoffbrand & Petit 1995, Beutler et al 2001).

## **1.2- O processo inflamatório na fisiopatogenia da Doença Falciforme**

O papel da inflamação na fisiopatologia da Hb SS tem sido alvo de recentes investigações. A polimerização da Hb que ocorre no interior dos eritrócitos faz com que eles se deformem, se tornem rígidos, obstruam o fluxo sanguíneo e, devido à perfusão insuficiente, causem dano tecidual. Os eritrócitos contendo Hb S tendem a ter alterações de membrana que os tornam rígidos e aderentes ao endotélio provocando assim uma resposta inflamatória ao obstruir o fluxo sanguíneo. Os tecidos não se encontram apenas insuficientemente irrigados, eles também se encontram expostos a citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e à ação das células ativadas que produzem ou respondem a essas citocinas e fatores de crescimento (Platt 2000, Wun 2001, Chies & Nardi 2001).

Estudos na microcirculação muscular de animais transgênicos falcêmicos mostraram as alterações advindas da resposta inflamatória subsequente a hipóxia seguida da reoxigenação: ocorre aumento da adesão e migração dos leucócitos e produção de radicais de oxigênio que contribuem para a inflamação do endotélio e dano tecidual (Kaul & Hebbel 2000).

A contagem anormalmente alta de leucócitos contribui para a maior gravidade das manifestações da doença. Foi demonstrado que pacientes com contagem elevada de leucócitos têm maior probabilidade de irem a óbito enquanto jovens, e é também um fator de risco para o desenvolvimento de infarto cerebral silencioso.

Altas contagens de leucócitos no começo da gestação indicam complicações nas pacientes com doença falciforme. (Litos et al, 2006).

A leucocitose também foi sugerida como sendo um forte indicador para se prever quais bebês com anemia falciforme vão desenvolver uma forma clínica mais grave da doença (Hebbel 2000).

Células de pacientes com doenças falciformes apresentam maior expressão de ligantes para as moléculas de adesão. Durante o episódio de infecção um número aumentado de leucócitos ativados secretam citocinas inflamatórias que ativam o endotélio vascular, não somente no local da inflamação, mas também em outras partes do organismo.

Além disso, proteínas citotóxicas e substâncias vasoativas como leucotrienos atraem e recrutam outros leucócitos para o local da inflamação. Os leucócitos ativados expressam mais moléculas de adesão do que os não ativados, dessa forma se ligando mais rapidamente ao endotélio ativado, o que leva à isquemia, infarte, dor e vaso-occlusão (Okpala 2004).

Os reticulócitos também participam do processo inflamatório, uma vez que migram e se aderem às células endoteliais causando congestionamento transitório de células vermelhas maduras desoxigenadas. Quanto mais jovens os reticulócitos, mais propensos à adesão. Quando essa obstrução eventualmente cessa, novos episódios de adesão de reticulócitos ao endotélio inflamado podem ocorrer, aumentando o número de leucócitos no local da inflamação. Estes episódios repetitivos de isquemia localizada e reperusão dão início a um estado de dano tecidual inflamatório crônico (Hebbel 2000).

Foi também demonstrado que células mononucleares estimuladas provenientes de pacientes com Hb SS liberam mais superóxido do que células de indivíduos normais. O superóxido inativa o óxido nítrico, que é um importante vasodilatador endógeno.

Assim, a produção de superóxido pelas células mononucleares de pacientes com anemia falciforme pode representar um risco adicional nas obstruções na microcirculação e danos teciduais nesses pacientes (Dias-Da-Motta et al 1996).

Aparentemente esse “stress” oxidativo torna as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) mais susceptíveis à oxidação, com subsequente dano às células endoteliais. Além disso, pacientes com Hb SS frequentemente apresentam hemólise, com liberação de Hb nos compartimentos vasculares. A Hb, por sua vez, é um potente oxidante de LDL, exacerbando, portanto, o processo de lesão celular e tecidual (Belcher et al 1999).

A polimerização da Hb S leva a desestabilização da membrana da hemácea com a destruição prematura do número total de eritrócitos sendo referida em torno de 10% a cada 24 horas. Na hemólise intravascular as barreiras difusionais que limitam as reações de NO e Hb são desfeitas, a Hb livre no plasma destrói o NO até 1000 vezes mais rápido do que a Hb intraeritrocitária, prejudicando assim a vasodilatação nestes pacientes (Reiter et al, 2002; Gladwin et al, 2005).

As alterações histopatológicas resultantes dos danos ao endotélio podem ser observadas nos leitos vasculares de órgãos como o baço, cérebro e retina. A ação das citocinas também contribui para a formação de trombozes e para a circulação anormal de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular (VCAM-1) e E-selectina no plasma, que têm a expressão induzida ou aumentada pela ação de citocinas e outros fatores inflamatórios.

A adesão dessas moléculas e de fatores pró-coagulantes no endotélio ativado tem um papel importante no recrutamento de leucócitos e na formação de trombos nos locais de inflamação (Belcher et al 2000).

A adesão de hemácias falcizadas ao endotélio é mediada por receptores localizados nas membranas das hemácias falcizadas e no endotélio (Montes et al 2002). As células falcizadas pró-adesivas se ligam a P-selectina, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, CD 36 das células endoteliais, e essas moléculas de adesão são, então, ativadas (Hebbel 1997, Pathare et al 2003).

### **1.3- Citocinas, hematopoiese e metabolismo do Fe**

A hematopoiese normal se caracteriza pelas interações das células tronco com a medula óssea e células do estroma através de moléculas de adesão, com as citocinas hematopoiéticas orquestrando a diferenciação em células maduras. As moléculas de adesão, além de promoverem a adesão de células progenitoras na medula óssea, também estão envolvidas na transmissão de sinais, na proliferação e na diferenciação celulares (Duits, et al 2003).

A hematopoiese é regulada por uma complexa rede de citocinas que atuam na proliferação e diferenciação de células sanguíneas, algumas estimulando, outras inibindo os diferentes processos. Estimulam a hematopoiese a c-kit ligante, também conhecida como fator de “stem cell” (CSF), a interleucina-3 (IL-3), o fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), o fator estimulante de colônia de monócito-macrófago (M-CSF), o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) e a interleucina 7 (IL-7).

Muitas das ações dos fatores estimulantes são influenciadas por outras citocinas. O fator de necrose tumoral (TNF), a linfotoxina (LT), o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de crescimento em transformação (TGF- $\beta$ ) são inibidores de crescimento das células progenitoras da medula óssea (Abbas et al 1994).

A IL-3 é um estimulador multilinhagem, que age sobre o crescimento de granulócitos, monócitos, megacariócitos, células eritróides e mastócitos. Interage com a eritropoietina (EPO) para estimular células precursoras eritróides, além de interagir com a G-CSF, GM-CSF e IL-7 (Umemura et al, 1989, Quesenberry & Colvin, 2001).

Os interferons são uma família de proteínas com uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo a inibição da replicação viral, regulação do crescimento celular e modulação da resposta imunológica, e têm ainda a capacidade de corrigir e diminuir a expressão de oncogenes e receptores de fatores de crescimento (Bourgeade et al 1992).

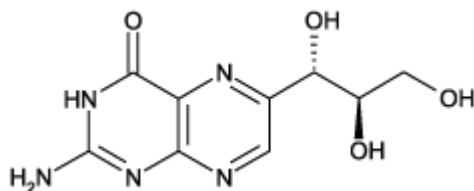
O IFN- $\gamma$ , uma glicoproteína monomérica produzida pelas células T (Th0, Th1 e CD8+) e “Natural Killer” (NK), é um poderoso potencializador das células do complexo maior de histocompatibilidade (CMH) classe I e induz CMH classe II em algumas células. Ele também é um poderoso ativador de macrófagos, conseqüentemente é um ativador de óxido nítrico (NO) e interleucina-1 (IL-1) (Byrd & Horwitz, 1993; Abbas et al, 1994; Brock & Mulero, 2000).

Os dados sobre a participação do IFN- $\gamma$  no processo inflamatório que acompanha a doença falciforme são contraditórios. Alguns autores relatam não haver diferença nos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  entre pacientes SS e controles (Raghupathy et al 2000), enquanto outros observaram níveis elevados (Taylor et al 1999, Walter et al, 2006) e mesmo reduzidos, o que poderia explicar a maior frequência e gravidade das infecções nesses pacientes (Taylor et al 1990).

Um aspecto interessante foi relatado sobre a influência do IFN- $\gamma$  sobre a síntese de Hb F na anemia falciforme e talassemia. Foi demonstrada a inibição de síntese de cadeia gama de globina em células de cultura de progenitores eritróides, estimuladas pelo ácido butírico e incubadas com IFN- $\gamma$  (Miller et al 1990).

Assim, pode-se supor que a elevação dos níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes SS, além de atuar no monócito/macrófago e, conseqüentemente, liberar radicais livres que participariam no processo obstrutivo e lesão tecidual, contribuiria para uma evolução clínica mais desfavorável, já que está demonstrado que pacientes que sintetizam mais Hb F tem melhor prognóstico dos que os menos produtores (Marcus & Ware 1999, Maier- Redelsperger et al 1994).

Um dos produtos da ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$  é a neopterina (NP), uma 2-amino-4 hidroxi (1'2'3'-trihidroxipropil)- pteridina, produzida a partir da guanosino trifosfato (GTP), via GTP ciclohidrolase I. (Hubber et al 1984, Werner et al 1990) (Figura 3).



**Figura 3-** Estrutura da NP (2-amino-4 hidroxi (1'2'3'-trihidroxipropil)- pteridina (Melichar et al 2006).

Como o IFN- $\gamma$  é liberado pelas células T ativadas, a NP é um marcador sensível da imunidade mediada por células e da ativação do monócito/macrófago (Berdowska & Zwirska-Korczala 2001, Wachter et al 1989).

A produção de NP foi demonstrada em outros tipos celulares, como por exemplo, células endoteliais, linfócitos B e células renais, porém esta produção está muito abaixo da produção liderada por monócitos/macrófagos (Melichar et al 2006).

A medida da concentração de NP é superior à quantificação do IFN- $\gamma$  como indicador de ativação celular porque a NP é mais estável, enquanto o IFN- $\gamma$  liberado se liga rapidamente às células e é removido da circulação (Fuchs et al 1991). A forte correlação entre a quantidade de NP produzida pelos monócitos/macrófagos e a capacidade dessas células liberarem peróxido de hidrogênio, sugere que as concentrações de NP refletem o nível de stress oxidativo causado pela ativação do sistema imune (Weiss et al 1998).

As formas reduzida e não reduzida da NP participam das reações mediadas por radicais livres de diversas maneiras: retirando radicais livres, se auto-oxidando e formando radicais superóxido, potencializando a formação de radicais oxigênio na presença do ferro iônico (Oetl et al 1999), aumentando o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da cloramina e seus efeitos contra micro-organismos (Weiss et al 1993).

Níveis elevados de NP foram observados em pacientes infectados por vírus, parasitas e bactérias intracelulares, assim como em pacientes com doenças auto-imunes, neoplasias (Fuchs et al 1993, Denz et al 1992), doença renal crônica e na fase terminal (Lhee et al 2006). Foi observado em doenças ginecológicas malignas que o aumento de NP está associado com a perda de Zinco urinário e com a diminuição da função e da quantidade de linfócitos no sangue periférico (Melichar et al 2006).

A elevação de NP no sangue ou na urina é um indicador precoce sensível para vários tipos de infecções virais como o HIV-1 e tem também valor prognóstico. Durante a infecção aguda por HIV, citomegalovírus ou rubéola, o aumento da concentração de NP pode ser observado mesmo antes dos anticorpos específicos serem detectados (Chan et al, 2006).

Em pacientes com Doença de Chagas foram observados valores séricos de NP mais elevados nas formas mais graves da doença, enquanto que pacientes com a forma intermediária mostraram valores similares ao grupo controle normal, sugerindo uma correlação entre níveis de NP e a extensão e gravidade da doença (Grotto et al 1994). Outro estudo mostra a relação entre o aumento de NP e dengue, sugerindo o uso da NP como preditor precoce do curso desta infecção (Chan et al, 2006).

Foi também estudada a participação da NP nos processos ateroscleróticos e em outros processos vasculares. Níveis elevados de NP foram observados em pacientes com doença coronariana aguda e crônica (Weiss et al 1994). A elevação dos níveis de NP é explicada pela ação de macrófagos ativados na formação e na ruptura das placas ateromatosas, uma vez que macrófagos ativados liberariam enzimas líticas que enfraqueceriam a cápsula fibrosa, rompendo a placa (Anwaar et al 1999). A ruptura da placa resulta na migração e ativação dos macrófagos da parede arterial e liberação de NP no sangue (Schumacher et al 1997).

Nos transplantes cardíacos a elevação da NP é indicativa de rejeição do enxerto (Müller et al 1998).

Foi avaliada a concentração de NP e da endotelina 1 (ET-1) durante as fases aguda e crônica da isquemia cerebral. Pacientes que sofreram episódio agudo de isquemia cerebral mostraram níveis plasmáticos crescentes de NP durante a evolução do quadro clínico, o que indica que com a progressão da doença há uma migração de monócitos/macrófagos para a parede arterial, levando à liberação de NP na circulação sanguínea.

A ET-1 permaneceu em níveis elevados durante o seguimento clínico, sugerindo que a produção de ET-1 em resposta à lesão endotelial persistiu após a fase aguda.

A elevação da NP seria indicativa da atividade inflamatória crônica e contínua ativação dos macrófagos na doença cerebrovascular isquêmica (Anwaar et al 1999).

#### 1.4- NP e eritropoiese

Pacientes com doenças crônicas mostram uma correlação inversa entre níveis de NP e Fe, NP e Hb, e NP e transferrina (Tf) e uma correlação positiva entre NP e ferritina sérica (FS), o que sugere a participação da NP na patogenia da anemia que acompanha as doenças crônicas (Weiss et al 1998, Melichar et al 2006). A correlação negativa entre NP e Hb foi descrita em pacientes com neoplasias hematológicas (Denz et al 1990), com infecção pelo HIV (Fuchs et al 1991), com artrite reumatóide (Reibnegger et al 1986), entre outros. A ação da NP sobre a hematopoiese pode resultar do distúrbio do Fe influenciado pelas citocinas e/ou pela sub-produção de EPO em resposta a hipóxia e anemia (Fuchs et al 1991). Essa última possibilidade foi reforçada pela demonstração do efeito inibitório da NP sobre a eritropoiese, estudada em rins de ratos perfundidos com NP. Houve uma redução nos níveis de RNAm e na síntese de EPO, além de um aumento na resistência vascular renal e na permeabilidade glomerular (Pagel et al 1999).

Uma das hipóteses de ação da NP no metabolismo do Fe seria o seu papel como agente redutor do  $\text{Fe}^{+++}$  em  $\text{Fe}^{++}$ , que contribuiria para a transferência do Fe da Tf para a apoferritina, com conseqüente diminuição do Fe circulante. A correlação negativa entre Fe sérico e NP em pacientes com doenças inflamatórias crônicas reforça essa idéia (Fuchs et al 1991, Weiss et al 1988).

Radicais livres são formados por macrófagos estimulados pelo  $\text{IFN-}\gamma$ , e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou NO, produzidos durante a inflamação, interferem na homeostase do Fe celular porque estimulam a afinidade de ligação das proteínas reguladoras do Fe (IRP) aos elementos responsivos ao Fe (IRE) presentes no RNAm da FS, da amino-levulinato eritróide sintase (e-ALAS) e receptores da transferrina (TfR). O NO estimula a ligação do IRP ao IRE, o que ocasionará uma maior síntese do TfR e uma repressão na expressão da ferritina e da e-ALAS. Com isso, há uma maior captação de Fe pelo TfR enquanto o consumo e estoque ficam diminuídos (Weiss 1999). O  $\text{IFN-}\gamma$  parece deprimir a expressão do TfR (Bourgeade et al 1992) e induz a expressão do RNAm da FS, enquanto o NO e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produzidos pela ativação do macrófago estimulado pelo  $\text{IFN-}\gamma$ , apresentam efeito inverso (Byrd & Horwitz 1993).

Foi demonstrada a participação do GM-CSF e da IL-3 na regulação da hematopoiese em pacientes SS, e a relação entre o nível plasmático dessas citocinas com o nível de Hb F, ou seja, com o nível de “stress” hematopoiético (Croizat 1994). Ampliando o estudo e avaliando outras citocinas, foi demonstrado que pacientes com Hb F < 8,5% e, portanto, com quadro anêmico mais grave, apresentavam níveis elevados de SCF e de GM-CSF, o que induziria a resposta de “stem cells” tanto precoces como tardias. No grupo de pacientes com Hb F > 8,5% foram observados níveis mais elevados de IL-3, responsável pelo recrutamento de populações de células dependentes de IL-3 e suficientes para manter níveis adequados de células vermelhas, enquanto valores de SCF abaixo do normal seriam justificados pela menor necessidade de recrutar células mais precoces, que estariam sob o controle negativo do TGF- $\beta$ . Os autores avaliaram o grau de eritropoiese nessas duas populações através da determinação dos níveis de receptor solúvel de transferrina (sTfR) (Croizat & Nagel 1999).

### **1.5- Receptor da transferrina como indicador do grau de eritropoiese**

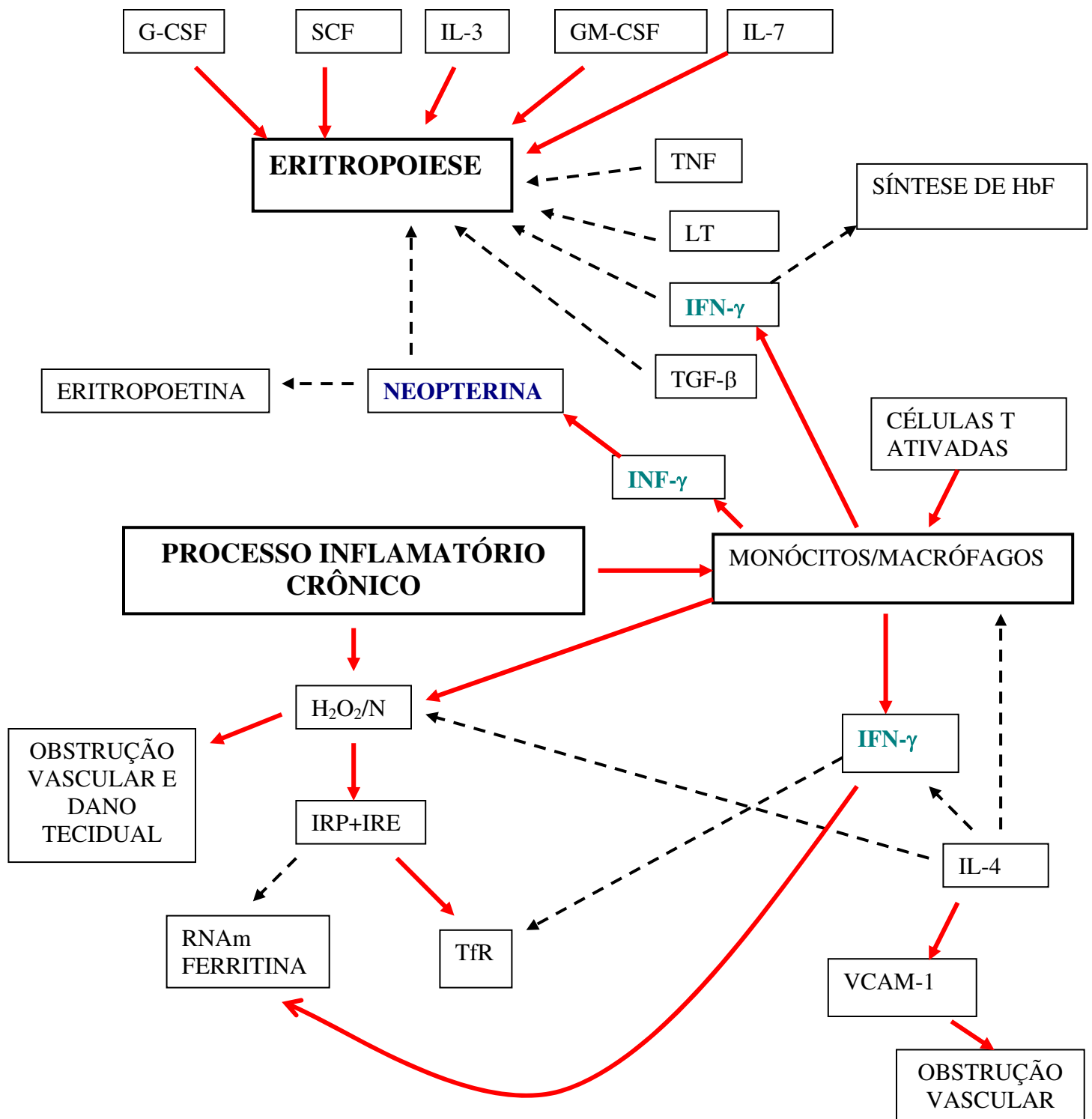
O Fe absorvido na parte proximal do intestino delgado é transportado no plasma pela Tf, uma proteína que possui uma alta afinidade pelo Fe em pH neutro. A Tf transfere o Fe para células através da interação com o seu receptor localizado na membrana celular. O TfR é codificado por um gene no cromossomo 3 e consiste de 2 subunidades protéicas, cada uma com uma massa molecular de 95 KDa. A Tf se liga ao receptor formando um complexo que é internalizado e o Fe é então liberado dentro do endossoma acidificado, sendo posteriormente metabolizado em heme na mitocôndria ou armazenado na forma de FS. Após a liberação do Fe a apotransferrina e o seu receptor retornam à circulação (Worwood 2002).

Precusores eritróides possuem uma grande quantidade de TfR em sua membrana. A quantidade de receptores na membrana é proporcional à necessidade de Fe da célula, assim, células com grande capacidade proliferativa ou células ferropênicas, possuem grande quantidade de TfR (Beguin 1992). O nível do sTfR no plasma ou soro é uma medida indireta do TfR total.

A concentração sérica do TfR está elevada quando há expansão da massa de células eritróides, como nas talassemias, anemias hemolíticas e policitemias, e está diminuída em pacientes com anemia aplástica e na insuficiência renal crônica. (Cook et al, 1993, Ponka & Lok 1999). A avaliação do sTfR tem sido apontada como de grande utilidade na distinção entre anemia ferropriva e anemia de doença crônica, uma vez que as medidas do sTfR não sofrem a interferência quando da associação com processos inflamatórios ou infecciosos, como acontece com a FS (Ferguson et al 1992, Abshire 1996).

Entretanto, a síntese dos TfRs pode ser negativamente regulada pelo IFN- $\gamma$  durante o processo inflamatório/infeccioso, já que a síntese amplificada do IFN- $\gamma$  estimula a captura do Fe da circulação, diminui a expressão do TfR e induz a expressão do RNAm da FS (Weiss 1999).

A figura 4 esquematiza a possível interação entre a eritropoiese, processo inflamatório crônico e distúrbio do metabolismo do Fe a partir dos dados da literatura aqui apresentados. O presente trabalho propõe estudar alguns aspectos relacionados à atuação da IL-3, do IFN- $\gamma$  e um dos seus produtos, a NP, levando-se em conta que os dados sobre o papel do IFN- $\gamma$  no processo inflamatório que acompanha a Doença Falciforme são contraditórios e os da NP são inexistentes. Através das determinações de NP pretende-se avaliar o grau de ativação do sistema monócito/macrófago e sua possível interferência na eritropoiese, estimada pelos níveis de sTfR. São também inexistentes na literatura dados sobre a ação de citocinas na hematopoiese em outras Doenças Falciformes, além da Hb SS. Pretendemos, então, estender o nosso estudo analisando pacientes com Hb SC.



## ***2- OBJETIVOS***

Os objetivos deste trabalho foram:

Avaliar a participação da IL3 e do IFN- $\gamma$  na hematopoiese em pacientes com Hb SS e Hb SC sob os seguintes aspectos:

- \* Ação da IL-3 como estimulante hematopoiético e de um antagonista ou inibidor, o IFN- $\gamma$ , sobre a atividade eritropoiética na doença falciforme, através da quantificação dos níveis de sTfR.
- \* O grau de ativação dos monócitos/macrófagos, através da determinação dos índices de NP e sua possível participação na hematopoiese e no processo inflamatório.
- \* A ação do IFN- $\gamma$  e da IL-3 sobre a síntese da Hb F.

### *3- CASUÍSTICA*

### 3.1- Grupos de estudo

**I – Grupo Controle:** 26 controles normais, de cor branca, com padrão eletroforético normal, sendo 18 mulheres e 8 homens, sem uso de medicamentos antiinflamatórios, sem anemia ou doença infecciosa/inflamatória.

**II – Grupo SS:** 35 pacientes com anemia falciforme, sendo 25 mulheres e 10 homens, no estado estável da doença, sem complicações clínicas e sem transfusão sanguínea há três meses.

**III – Grupo SC:** 15 pacientes com hemoglobinopatia SC, sendo 7 mulheres e 8 homens, no estado estável da doença, sem complicações clínicas e sem transfusão sanguínea há três meses.

Esses pacientes foram atendidos no Hemocentro-UNICAMP. O Termo de Consentimento foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética da FCM/UNICAMP (Anexo 1).

Todos os pacientes eram adultos e não faziam uso de hidroxiuréia.

## ***4- MÉTODOS***

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa. Os soros foram estocados em freezer à -80°C.

#### **4.1- Diagnóstico das hemoglobinopatias**

- Hematimetria completa de sangue colhido com EDTA, feita no aparelho automatizado Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan).
- Determinação do padrão eletroforético das Hbs por HPLC - “high-performance liquid chromatography” (Bio-Rad VARIANT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).
- Quantificação de Hb F por HPLC (Bio-Rad VARIANT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

#### **4.2 – Avaliação do metabolismo do Fe**

- Dosagens de ferro sérico e da capacidade total de ligação do ferro (TIBC) à Tf: ensaio colorimétrico (Synermed International, Westfield, Indiana, USA).
- Dosagem de FS: por eletroquimioluminescência (Elecsys 2010, Roche Diagnostic, Alemanha).

#### **4.3- Avaliação do processo inflamatório**

- Dosagem de IFN- $\gamma$ : ensaio imunoenzimático pelo método de ELISA: (kit human IFN- $\gamma$ , Pharmigen, San Diego, CA, USA).
- Dosagem de IL-3: ensaio imunoenzimático pelo método de ELISA: (kit R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).
- Dosagem de NP: ensaio imunoenzimático pelo método de ELISA: (kit IBL Imuno-Biological Laboratories, Hamburg, Alemanha).

#### **4.4- Avaliação da atividade eritropoiética**

- Dosagem de EPO: por quimioluminescência: (kit Immulite EPO, Immulite® /DPC, Los Angeles, CA, USA).
- Dosagem de sTfR: por nefelometria: (Dade Behring, Marburg, Alemanha).
- Contagem de Rtc por citometria de fluxo em equipamento automatizado (Sysmex XE 2100, Sysmex, Kobe, Japão).

#### **4.5- Avaliação do processo hemolítico**

- Dosagem das bilirrubinas, indireta, direta e total: ensaios colorimétricos: (Hitachi-917 /Roche, Alemanha).

#### **4.6- Metodologia estatística**

A caracterização dos grupos estudados foi feita através de análise descritiva, com determinação dos valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo.

Para comparação de proporções foi utilizado o teste Qui-quadrado e para comparação de variáveis contínuas entre dois grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Quando três ou mais grupos foram comparados foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para verificar a correlação entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

A apresentação gráfica foi feita através de box-plots e diagramas de dispersão. Todos os cálculos foram realizados no SAS System for Windows, versão 8,2, do SAS Institute Inc, Cary, NC, USA e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$  (5%).

## ***5- RESULTADOS***

## 5.1- Perfil hematológico dos grupos estudados

Analisando inicialmente os dados hematimétricos foi observado que, como esperado, o grau de anemia foi mais grave nos pacientes SS do que nos SC, de acordo com os valores de Hb encontrados (mediana = 8,20 g/dL *versus* 12,0 g/dL) e ambos foram menores do que no grupo controle (mediana 14,0 g/dL,  $p < 0,0001$ ). Quanto ao VCM, os resultados mostraram que estes foram maiores no grupo controle (mediana = 89,3 fL), quando comparados ao grupo SC (mediana = 80,1 fL) e este foi menor do que no grupo SS (mediana = 88,7 fL,  $p = < 0,0001$ ). Os valores de HCM acompanharam os de VCM, sendo inferiores no grupo SC em relação ao controle e SS, mas sem diferença entre SS e controle (Tabela 1).

O grau de hemólise evidenciado através dos valores dos reticulócitos (Rtc) em números absolutos, foi maior nos pacientes SS (mediana =  $246,8 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) do que no grupo SC (mediana =  $108,9 \times 10^6/\mu\text{L}$ ), e ambos maiores que no grupo controle (mediana =  $43,2 \times 10^6/\mu\text{L}$ ,  $p < 0,0001$ ). Os resultados referentes às dosagens de bilirrubinas foram semelhantes aos observados nas contagens de Rtc, com maiores níveis de bilirrubinas total e indireta no grupo SS, seguido pelo SC e ambos maiores que no grupo controle.

A contagem de leucócitos foi significativamente mais alta no grupo SS (mediana =  $9,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) quando comparada com os grupos SC (mediana =  $7,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $p = 0,0001$ ) e grupo controle (mediana =  $6,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ ,  $p = 0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos SC e controle. Os resultados referentes à dosagem de Hb F mostraram valores significativamente maiores no grupo SS (mediana = 6,3 %) em relação aos grupos controle (mediana = 1,05%) e SC (mediana = 1,50%) e houve também uma diferença significativa entre os grupos SC e controle (Figura 5).

Quanto aos parâmetros relacionados ao metabolismo do Fe, observamos que pacientes SS e SC apresentaram valores significativamente mais baixos de Fe do que o grupo controle ( $p = 0,0021$ ) (Figura 6). Valores também significativamente inferiores de TIBC foram obtidos no grupo SS em relação aos grupos SC e controle e entre SC e controle

( $p < 0,0001$ ) (Figura 7). Por outro lado, as maiores medianas de dosagens de FS foram observadas nos pacientes com doenças falciformes em relação ao controle, mas não entre os grupos anêmicos (Figura 8).

Maiores estímulo e atividade eritropoiética evidenciados pelas dosagens de EPO e sTfR foram observadas no grupo de pacientes SS e SC em relação aos controles e no grupo SS em relação ao grupo SC ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 9 e 10).

**Tabela 1-** Valores hematimétricos e do estado do Fe nos grupos controle, SC e SS.

| Variáveis                       | Grupo Controle (n=26) |         |             | Grupo SC (n=15)    |         |             | Grupo SS (n=35)    |         |             | p-valor | ≠ entre grupos |
|---------------------------------|-----------------------|---------|-------------|--------------------|---------|-------------|--------------------|---------|-------------|---------|----------------|
|                                 | Média +/- SD          | Mediana | Intervalo   | Média +/- SD       | Mediana | Intervalo   | Média +/- SD       | Mediana | Intervalo   |         |                |
| <b>Hb (g/dL)</b>                | 14,3<br>+/- 1,35      | 14,0    | 12,0-17,3   | 12,0<br>+/- 1,43   | 12,0    | 9,5-14,1    | 8,1<br>+/- 1,77    | 8,2     | 5,4-14,1    | <0,0001 | CXSS, SSXSC    |
| <b>VCM (fL)</b>                 | 89,8<br>+/- 2,26      | 89,3    | 85,2-94,9   | 80,4<br>+/- 5,55   | 80,1    | 68,4-91,7   | 88,5<br>+/- 14,6   | 88,7    | 24,2-118,6  | <0,0001 | CXSC, SSXSC    |
| <b>HCM (pg)</b>                 | 31,1<br>+/- 0,96      | 31,1    | 29,1-33,1   | 28,9<br>+/- 1,87   | 29,0    | 24,5-32,6   | 31,7<br>+/- 4,10   | 31,7    | 22,0-42,6   | 0,0004  | CXSC, SSXSC    |
| <b>Rtc (%)</b>                  | 1,0<br>+/- 0,43       | 1,0     | 0,4-2,1     | 2,9<br>+/- 1,31    | 2,2     | 1,3-5,1     | 10,2<br>+/- 5,08   | 9,3     | 2,2-25,2    | <0,0001 | Todos          |
| <b>Rtc#(x10<sup>6</sup>/μL)</b> | 46,3<br>+/- 19,7      | 43,2    | 18,9-93,1   | 114,0<br>+/- 43,4  | 108,9   | 63,9-201,3  | 268,6<br>+/- 102,9 | 246,8   | 131,5-606,2 | <0,0001 | Todos          |
| <b>GB#(x10<sup>3</sup>/μL)</b>  | 6,7<br>+/- 1,87       | 6,6     | 3,3-11,5    | 7,8<br>+/- 2,93    | 7,9     | 3,2-12,6    | 9,7<br>+/- 2,54    | 9,3     | 4,01-15,2   | <0,0001 | CXSS, SSXSC    |
| <b>Hb F (%)</b>                 | 0,9<br>+/- 0,38       | 1,05    | 0,30-1,30   | 1,8<br>+/- 1,54    | 1,5     | 0,3-6,1     | 8,4<br>+/- 6,06    | 6,3     | 0,7-22,0    | <0,0001 | Todos          |
| <b>BT (mg/dL)</b>               | 0,7<br>+/- 0,41       | 0,55    | 0,30-2,20   | 1,6<br>+/- 0,66    | 1,5     | 0,5-3,1     | 3,5<br>+/- 2,43    | 3,1     | 0,9-13,9    | <0,0001 | Todos          |
| <b>BI (mg/dL)</b>               | 0,5<br>+/- 0,31       | 0,45    | 0,20-1,60   | 1,2<br>+/- 0,52    | 1,1     | 0,3-2,4     | 2,7<br>+/- 1,95    | 2,2     | 0,7-9,5     | <0,0001 | Todos          |
| <b>Fe (μg/dL)</b>               | 63,4<br>+/- 29,1      | 58,0    | 36,0-158,0  | 69,7<br>+/- 30,4   | 65,0    | 30,0-97,0   | 64,6<br>+/- 20,4   | 63,0    | 25,0-120,0  | 0,0021  | CXSS, CXSC     |
| <b>TIBC (μg/dL)</b>             | 372,1<br>+/- 50,5     | 372,5   | 291,0-493,0 | 319,3<br>+/- 65,7  | 329,0   | 192,0-449,0 | 234,6<br>+/- 68,6  | 236,0   | 87,0-390,0  | <0,0001 | Todos          |
| <b>FS (ng/mL)</b>               | 82,4<br>+/- 69,6      | 51,9    | 13,0-252,6  | 319,4<br>+/- 459,4 | 201,3   | 16,7-1773,0 | 447,4<br>+/- 678,9 | 118,7   | 27,5-2385,0 | 0,0028  | CXSS, CXSC     |
| <b>sTfR (mg/L)</b>              | 1,6<br>+/- 0,57       | 1,5     | 0,9-3,1     | 3,6<br>+/- 0,91    | 3,58    | 2,2-6,0     | 9,8<br>+/- 3,49    | 9,8     | 3,19-19,5   | <0,0001 | Todos          |
| <b>EPO(mU/mL)</b>               | 8,9<br>+/- 3,22       | 8,3     | 4,2-17,2    | 34,0<br>+/- 21,0   | 27,5    | 12,2-95,3   | 80,0<br>+/- 53,6   | 64,1    | 16,2-274,0  | <0,0001 | Todos          |

**Hb:** hemoglobina; **VCM:** volume corpuscular médio; **HCM:** hemoglobina corpuscular média; **Rtc:** reticulócitos; **GB:** glóbulos brancos;

**Hb F:** hemoglobina Fetal; **BT:** bilirrubina Total; **BI:** bilirrubina indireta; **Fe:** ferro; **TIBC:** capacidade total de ligação do Fe à transferrina; **FS:** ferritina sérica; **sTfR:** receptor solúvel de transferrina; **EPO:** eritropoietina, **SC:** hemoglobinopatia SC, **SS:** anemia falciforme.

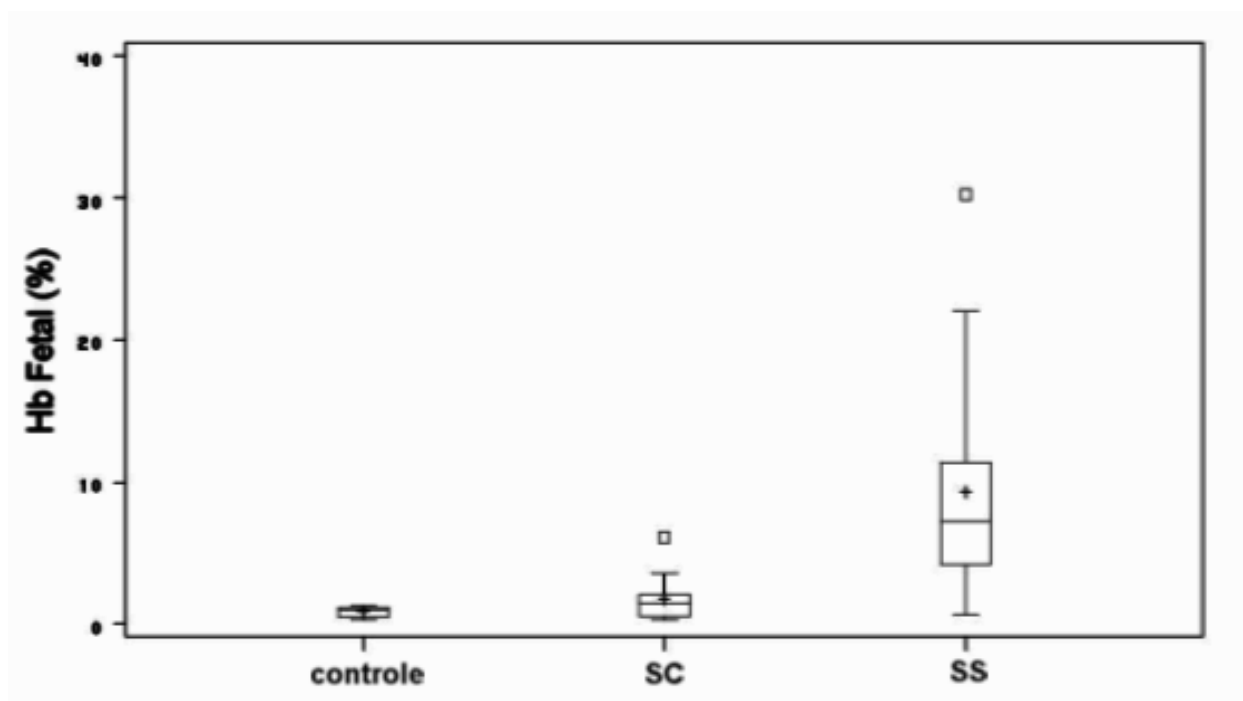
## 5.2- Avaliação da participação de fatores inflamatórios na atividade eritropoiética

Na Tabela 2 constam os dados referentes às quantificações séricas de citocinas e da NP. A IL-3 não foi detectável em todas as amostras estudadas. No grupo controle pudemos detectá-la em 12 dos 26 indivíduos; no grupo SS em 19 dos 35 pacientes e no grupo SC em 7 dos 15 pacientes. As dosagens de IL-3 foram significativamente mais altas nos grupos SS e SC em relação ao controle ( $p=0,0350$  e  $p=0,0280$ , respectivamente), mas não diferiu entre os grupos falciformes (Figura 13).

**Tabela 2-** Valores das medianas de IL-3, IFN- $\gamma$  e NP nos grupos estudados.

|                       | C            | SS           | SC           | Valor $p$       | Diferenças |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|------------|
| IL-3 (pg/mL)          | 17,3 (n= 12) | 46,6 (n= 19) | 67,3 (n= 7)  | <b>0,0280</b>   | SC X C     |
|                       | (3,1-116,4)  | (11,5-296,0) | (20,2-145,0) | <b>0,0350</b>   | SS X C     |
| IFN- $\gamma$ (pg/mL) | 2,0 (n= 12)  | 2,5 (n= 19)  | 2,0 (n= 7)   | NS              | -          |
|                       | (1,1-6,0)    | (1,1-22,0)   | (1,1-3,6)    |                 |            |
| NP (nmol/L)           | 3,9 (n= 26)  | 6,9 (n= 35)  | 5,9 (n= 15)  | < <b>0,0001</b> | SS X C     |
|                       | (2,2-7,5)    | (2,8-33,0)   | (2,5-8,9)    | <b>0,0303</b>   | SC X C     |
|                       |              |              |              | 0,2095          | SS X SC    |

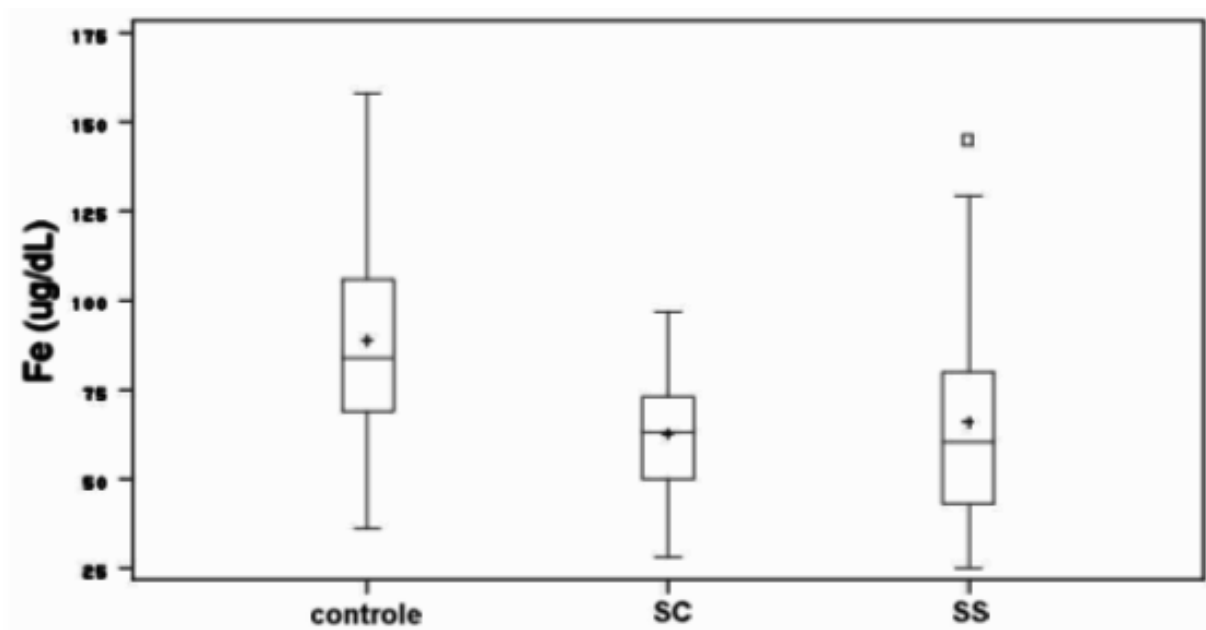
**IL-3:** interleucina 3; **IFN- $\gamma$ :** interferon  $\gamma$ ; **NP:** neopterina; **C:** Controle; **SS:** anemia falciforme; **SC:** hemoglobinopatia SC; **NS:** Não significativo.



**Figura 5-** Boxplots referentes às porcentagens de Hb F nos grupos Controle, SC e SS.

+ = media.

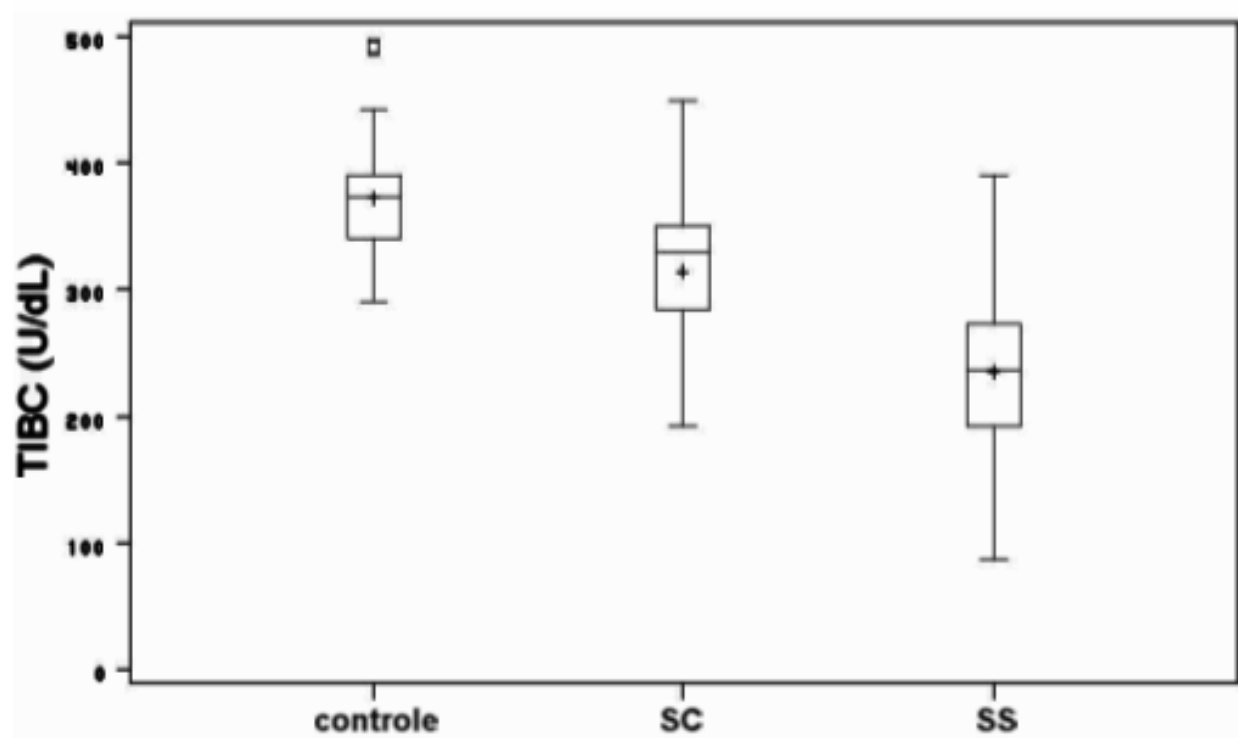
— = mediana



**Figura 6-** Boxplots referentes às dosagens de ferro sérico nos grupos Controle, SC e SS.

+ = media.

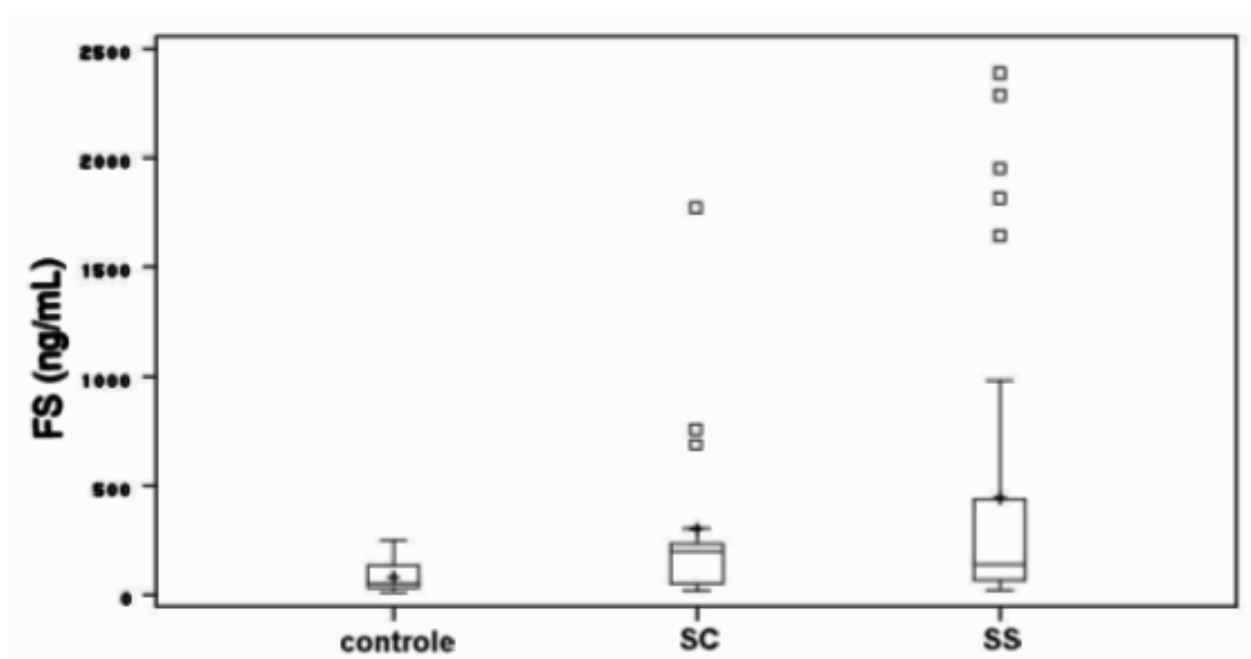
— = mediana



**Figura 7-** Boxplots referentes às dosagens de TIBC nos grupos Controle, SC e SS.

+ = média.

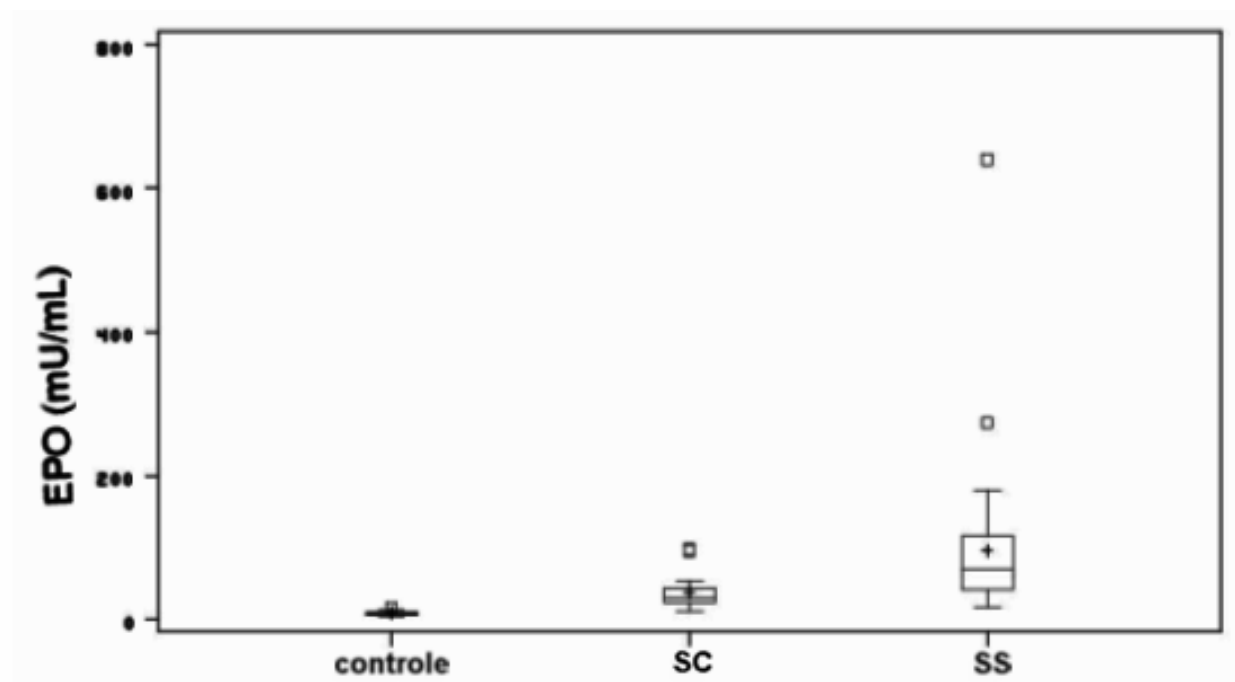
— = mediana



**Figura 8-** Boxplots referentes às dosagens de FS nos grupos Controle, SC e SS.

+ = media.

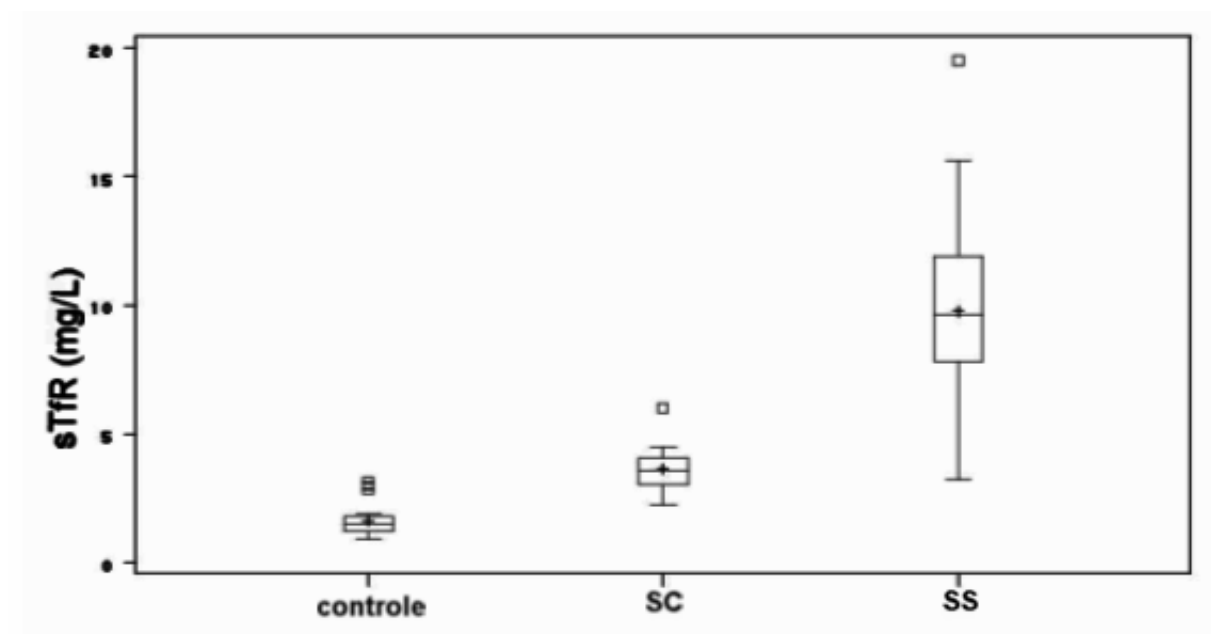
— = mediana



**Figura 9-** Boxplots referentes às dosagens de EPO nos grupos Controle, SC e SS.

+ = media.

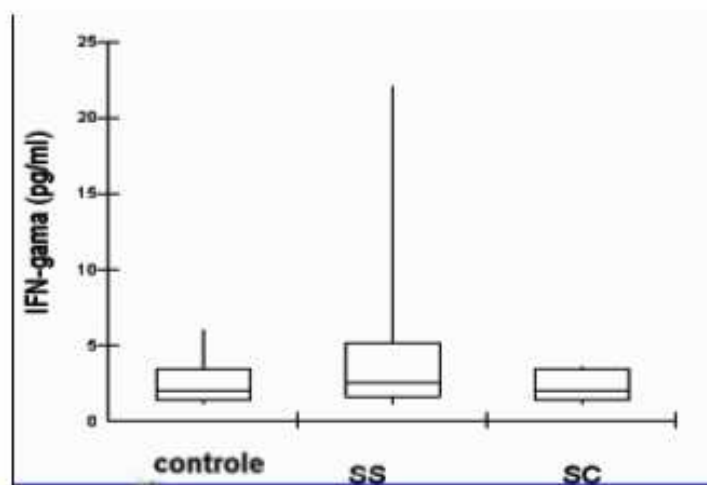
— = mediana



**Figura 10-** Boxplots referentes às dosagens de sTfR nos grupos Controle, SC e SS.

+ = media.

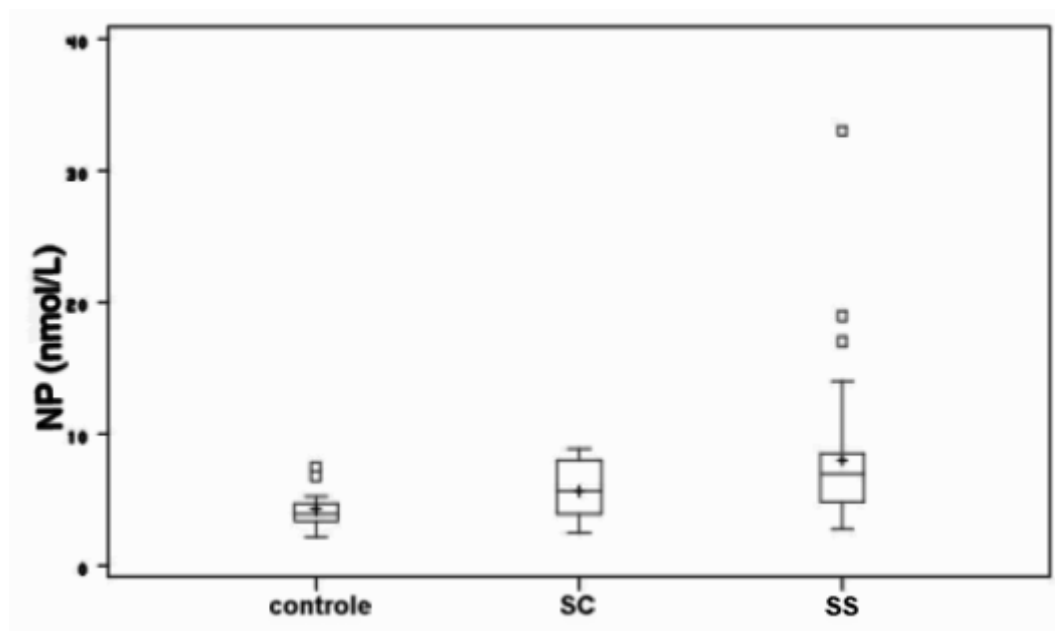
— = mediana



**Figura 11-** Boxplots referentes às dosagens de INF- $\gamma$  nos grupos Controle, SC e SS.

— = mediana

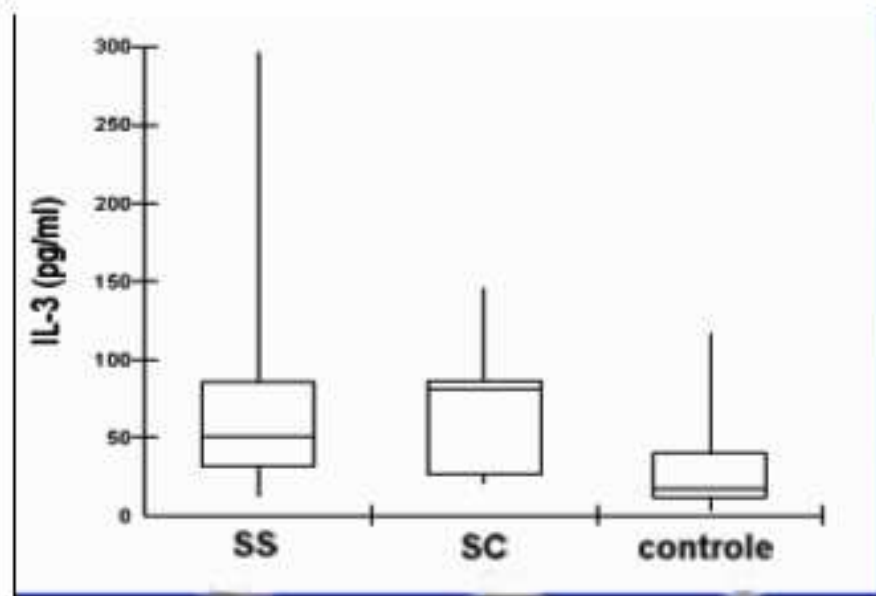
A NP foi quantificada em todas as amostras e os resultados mostraram valores significativamente mais elevados nos grupos SS e SC em relação ao controle ( $p < 0,0001$  e  $0,0336$ , respectivamente), mas não houve diferença entre os 2 grupos de pacientes (Tabela 2 e Figura 12).



**Figura 12-** Boxplots referentes às dosagens de NP nos grupos Controle, SC e SS.

+ = media.

— = mediana



**Figura 13-** Boxplots referentes às dosagens de IL-3 nos grupos Controle, SC e SS.

— = mediana

Adotando os parâmetros sugeridos por Croizat & Nagel (1999), subdividimos os pacientes SS de acordo com os níveis de Hb F. 21 pacientes mostraram valores de Hb F < 8,5% (LHbFSS) e 17 apresentaram HbF > 8,5% (HHbFSS). Valores significativamente mais baixos de Hb total e IL-3 foram observados no grupo de pacientes LHbFSS ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os demais parâmetros analisados (Tabela 3).

**Tabela 3-** Comparação das medianas dos parâmetros laboratoriais entre os grupos com Hb F > 8,5% e Hb F < 8,5%

|                                        | HHbFSS (n=17)                 | LHbFSS (n=21)                 | Valor <i>p</i> |
|----------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>EPO (mU/mL)</b>                     | 46,7<br>(16,2 – 179,0)        | 71,9<br>(24,7 – 200,0)        | 0,0716         |
| <b>Hb (g/dL)</b>                       | 8,65<br>(6,5 – 14,4)          | 7,1<br>(5,4 – 10,2)           | <b>0,0116</b>  |
| <b>IL-3 (pg/mL)</b>                    | 74,7 (n=11)<br>(11,5 – 296,0) | 32,6 (n=10)<br>(14,4 – 103,0) | <b>0,0338</b>  |
| <b>NP (nmol/L)</b>                     | 6,2<br>(3,1 – 14,0)           | 7,0<br>(2,8 – 33,0)           | 0,3722         |
| <b>sTfR (mg/L)</b>                     | 8,74<br>(3,19 – 19,5)         | 10,2<br>(6,93 – 15,6)         | 0,3206         |
| <b>IFN-<math>\gamma</math> (pg/mL)</b> | 2,0 (n=6)<br>(1,1 – 16,7)     | 2,7 (n=13)<br>(1,6 – 22,0)    | 0,40470        |
| <b>FS (ng/mL)</b>                      | 263,2<br>(44,0 – 2385,0)      | 93,3<br>(27,5 – 1952,0)       | 0,0529         |

**HHbFSS:** hemoglobina Fetal  $\geq 8,5\%$  no grupo SS; **LHbFSS:** hemoglobina Fetal < 8,5% no grupo SS; **EPO:** eritropoietina; **Hb:** hemoglobina; **IL-3:** interleucina 3; **NP:** neopterina; **sTfR:** receptor solúvel da transferrina; **INF- $\gamma$ :** interferon  $\gamma$ ; **FS:** ferritina sérica.

Correlacionando as variáveis relacionadas a hematopoiese com as indicativas de atividade inflamatória, observamos que houve correlação inversa entre Hb F e EPO, correlação positiva entre Hb F e Hb, IL-3 e Hb F, NP e Rtc, e sTfR e Rtc. No grupo SC a única correlação obtida foi entre sTfR e Rtc. Essas correlações, embora significativas ( $p < 0,05$ ), foram consideradas moderadas ou fracas (Tabela 4).

**Tabela 4-** Correlação das medianas entre as variáveis avaliadas nos grupos controle e pacientes.

|                   | GRUPOS                        |                               |                               |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                   | C                             | SS                            | SC                            |
| <b>Hb X EPO</b>   | NR                            | $r = -0,3188$<br>$p = 0,0618$ | $r = -0,3821$<br>$p = 0,1597$ |
| <b>Hb F X EPO</b> | NR                            | $r = -0,3915$<br>$p = 0,0200$ | $r = 0,1720$<br>$p = 0,5398$  |
| <b>Hb F X Hb</b>  | $r = 0,1919$<br>$p = 0,3476$  | $r = 0,3442$<br>$p = 0,0428$  | $r = -0,3082$<br>$p = 0,2636$ |
| <b>Hb X sTfR</b>  | $r = 0,3218$<br>$p = 0,1088$  | $r = -0,0571$<br>$p = 0,7444$ | $r = -0,2714$<br>$p = 0,3277$ |
| <b>IL3 X Hb</b>   | $r = 0,2535$<br>$p = 0,2114$  | $r = 0,4633$<br>$p = 0,0457$  | $r = -0,3243$<br>$p = 0,4779$ |
| <b>IL3 X Hb F</b> | $r = -0,0400$<br>$p = 0,8460$ | $r = 0,4677$<br>$p = 0,0434$  | $r = -0,4685$<br>$p = 0,2889$ |
| <b>NP X Hb</b>    | $r = 0,2943$<br>$p = 0,1444$  | $r = -0,1747$<br>$p = 0,3155$ | $r = 0,1146$<br>$p = 0,6843$  |
| <b>NP X Rtc</b>   | $r = -0,0504$<br>$p = 0,8067$ | $r = 0,3769$<br>$p = 0,0197$  | $r = -0,0368$<br>$p = 0,8884$ |
| <b>sTfR X Rtc</b> | $r = -0,0216$<br>$p = 0,9165$ | $r = 0,5234$<br>$p = 0,0007$  | $r = 0,4877$<br>$p = 0,0470$  |

**Hb:** hemoglobina; **EPO:** eritropoietina; **Hb F:** hemoglobina fetal; **sTfR:** receptor solúvel de transferrina; **IL-3:** interleucina 3; **NP:** neopterin, **Rtc:** reticulócitos; **C:** Controle; **SS:** anemia falciforme; **SC:** hemoglobinopatia SC; **NR:** Não realizado.

Quando os pacientes foram subdivididos de acordo com os níveis de Hb F, foram observadas as seguintes correlações entre as variáveis estudadas: forte correlação positiva entre níveis de IL-3 e Hb F no grupo com Hb F > 8,5% ( $r = 0,8833$ ,  $p = 0,0016$ ) e moderada correlação negativa no grupo com HbF < 8,5% ( $r = -0,7052$ ,  $p = 0,0227$ ). Nesse mesmo grupo foi observada correlação inversa entre níveis de Hb total e Hb F ( $r = -0,6524$ ,  $p = 0,0408$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5-** Correlação das medianas entre as variáveis nos grupos de pacientes SS com Hb F > 8.5% e Hb F < 8.5%.

|                   | <b>HHbF</b>                                    | <b>LHbF</b>                                     |
|-------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>sTfR X NP</b>  | $r = 0,3665$<br>$p = 0,1477$                   | $r = -0,0043$<br>$p = 0,9852$                   |
| <b>HbF X sTfR</b> | $r = -0,1645$<br>$p = 0,5280$                  | $r = 0,0025$<br>$p = 0,9915$                    |
| <b>IL3 X Hb</b>   | $r = 0,2333$<br>$p = 0,5457$                   | $r = 0,3465$<br>$p = 0,3266$                    |
| <b>IL3 X Hb F</b> | $r = 0,8833$<br><b><math>p = 0,0016</math></b> | $r = -0,7052$<br><b><math>p = 0,0227</math></b> |
| <b>Hb X Hb F</b>  | $r = 0,333$<br>$p = 0,3807$                    | $r = -0,6524$<br><b><math>p = 0,0408</math></b> |
| <b>NP X Hb</b>    | $r = 0,3539$<br>$p = 0,2144$                   | $r = -0,3515$<br>$p = 0,1180$                   |
| <b>Hb X sTfR</b>  | $r = 0,2288$<br>$p = 0,4313$                   | $r = -0,1859$<br>$p = 0,4198$                   |

**HHbF:** hemoglobina Fetal  $\geq 8,5\%$ ; **LHbF:** hemoglobina Fetal  $< 8,5\%$ ; **sTfR:** receptor solúvel de transferrina; **NP:** neopterina; **Hb F:** hemoglobina Fetal; **IL-3:** interleucina 3; **Hb:** hemoglobina

## *6- DISCUSSÃO*

A Hb S, produto de uma mutação de ponto na cadeia de globina, interage com produtos de diversos genes e com fatores ambientais, resultando em uma condição clínica multifatorial (Steinberg et al 2001). A oclusão vascular, principal causa de lesão em diversos órgãos é o resultado de interações adesivas entre hemácias falcizadas, leucócitos, plaquetas, elementos plasmáticos, parede vascular e eritrócitos não falcizados (Okpala 2006). A recorrência das reações vaso-oclusivas na microcirculação ocasiona as crises dolorosas devido à má perfusão e hipóxia teciduais. A cronicidade dos bloqueios do fluxo sanguíneo leva à lesão degenerativa dos órgãos. A CVO inicia-se com a adesão de hemácias falcizadas densas e rígidas e Rctcs ao endotélio vascular. Condições como hipóxia, infecção e aumento das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias ativam o endotélio vascular e leucócitos. Células endoteliais e leucócitos ativados expressam mais as moléculas de adesão, como integrinas e moléculas de adesão intercelulares (ICAMs). Com isso é maior o número de leucócitos, células endoteliais e hemácias aderidas umas às outras, o que diminui a luz vascular progressivamente, até a completa oclusão (Frenette 2004, Okpala 2004, Okpala 2006).

Além dos fatores celulares, outras alterações plasmáticas contribuem para a oclusão microvascular na doença falciforme. Foram demonstradas alterações em fatores da coagulação e na função endotelial desses pacientes, levando a um estado de hipercoagulabilidade, que também contribuem para a vaso-oclusão (Mohan et al 2005).

A vasodilatação deficiente agrava o processo e parece ser decorrente de um defeito na biodisponibilidade de NO, devido à retenção de NO nos grupos heme e inibição da formação de S-nitrohemoglobina, importante mediador da vasodilatação na hipóxia (Pawloski et al 2005, Reitere et al 2002).

A conjunção de tantos e diversos processos culmina com um estado inflamatório crônico ou sub-clínico nos pacientes com doença falciforme.

No trabalho aqui apresentado, estudamos alguns aspectos relacionados ao envolvimento do processo inflamatório na patogenia das doenças falciformes e, mais especificamente, da IL-3, do IFN- $\gamma$  e de um produto da ativação dos monócitos/macrófagos, a NP.

A IL-3 é um produto das células T CD4 + , conhecida como fator estimulante de colônia multilinhagem, porque age nos progenitores medulares mais imaturos e promove a expansão das células que vão se diferenciar em todos os tipos maduros de células (Abbas et al 1994). Na eritropoiese a IL-3 interage com a EPO, estimulando as células precursoras (Quesenberry & Colvin 2001).

Estudos anteriores mostraram que o número e a atividade das BFU-E eram diferentes entre os pacientes SS, quando agrupados de acordo com o nível de Hb F. Naqueles com Hb F < 9,0% o número de BFU-E circulantes era maior, o grau de síntese de DNA estava elevado e as células BFU-E eram responsivas tanto ao GM-CSF como à IL-3. Já no grupo com Hb F > 9,0% o número de BFU-E era normal, as células encontravam-se predominantemente em repouso e eram responsivas somente ao IL-3 (Croizat 1993, Croizat & Nagel 1999). Posteriormente foi demonstrado que os níveis plasmáticos de GM-CSF e IL-3 eram afetados pelas concentrações de Hb F, e permaneciam constantes durante o período de 1 ano, o que reforçou a hipótese da correlação dessas citocinas ao grau de stress hematopoiético crônico. Por outro lado, as dosagens de IL-1 e IL-6 não mostraram correlação com os níveis de Hb F, e as oscilações nas suas dosagens provavelmente refletiam uma resposta geral à lesão ou inflamação (Croizat 1994).

Nossos dados mostraram valores significativamente mais elevados de IL-3 nos grupos SS e SC em relação ao controle e a correlação positiva entre IL-3 e Hb F no grupo SS reforçaram a hipótese sugerida por Croizat (1994) e Steinberg (2006) sobre a influência da IL-3 sobre a síntese da Hb F. Quando os pacientes foram subdivididos de acordo com os níveis de Hb F (> ou < 8,5%), foram observados valores significativamente mais elevados de IL-3 no grupo com Hb F > 8,5%. Foi relatado que citocinas estimulantes da eritropoiese, como SCF e o GM-CSF tinham suas concentrações séricas mais elevadas nos pacientes com menores níveis de Hb F do que nos que apresentavam altas porcentagens dessa Hb. Por outro lado, o TGF- $\beta$ , que é um inibidor do crescimento celular, foi encontrado em quantidades inferiores nos pacientes com baixos índices de Hb F, ficando assim caracterizado o permanente estado de atividade eritropoiética nos pacientes com menores quantidades de Hb F e, portanto, sujeitos à maior stress hematopoiético (Croizat & Nagel 1999).

Pacientes com maiores concentrações de Hb F apresentam menor grau de polimerização da Hb S, o que contribui para uma melhor evolução clínica. No grupo por nós estudado, essa diferença na apresentação clínica pode ser evidenciada por níveis significativamente mais elevados de Hb total nos pacientes com maiores concentrações de Hb F. Entretanto, não foi possível demonstrar um menor grau de atividade eritropoiética, supostamente resultante de um menor stress hematopoiético, nesses indivíduos, uma vez que os níveis de sTfR não foram diferentes entre os 2 grupos. Embora o valor da mediana dos níveis de EPO tenha sido menor no grupo HHbFSS, essa diferença não foi significativa. Da mesma maneira, as contagens de Rtc não diferiram entre os grupos.

Em um estudo realizado anteriormente em que foram estudados pacientes com e sem uso de hidroxiuréia (HU), observamos diferença estatisticamente significativa nos valores de Rtc ( $74,9 \times 10^9/L$  versus  $174,5 \times 10^9/L$  – valores das medianas nos grupos com e sem HU, respectivamente,  $p = 0,0015$ ). A redução do número de Rtc no grupo com HU foi principalmente às custas da menor liberação de Rtc imaturos, sabidamente mais adesivos às células endoteliais (Borba et al 2003). O conjunto desses dados reforça a idéia de que pacientes em uso de HU têm sua melhora clínica não somente devido à maior síntese de Hb F, mas também graças aos demais efeitos da HU sobre a produção de novos Rtc e leucócitos, minimizando os efeitos do processo inflamatório.

O IFN- $\gamma$ , citocina produzida por células Th1, apresenta diversas propriedades, como: é um potente ativador de fagócitos mononucleares, age diretamente sobre linfócitos T e B promovendo sua diferenciação, ativa neutrófilos, estimula a atividade citolítica das células NK e é ativador das células endoteliais vasculares. É também um dos inibidores do crescimento das células progenitoras da medula óssea (Abbas et al 1994).

A ação do IFN- $\gamma$  sobre a eritropoiese tem sido amplamente investigada no que se refere a fisiopatogenia da anemia e às alterações do metabolismo do Fe que acompanham pacientes com doenças crônicas. Means (1999) em revisão sobre a fisiopatologia da anemia de doença crônica (ADC), lista os potenciais mecanismos em que o IFN- $\gamma$  estaria envolvido: bloqueio na resposta da EPO à anemia, inibição da resposta dos progenitores eritróides, promoção da apoptose de progenitores eritróides, menor expressão dos

receptores da EPO e maior síntese de FS. A relação IFN- $\gamma$  e FS tem 2 pontos distintos: por um lado o IFN- $\gamma$  induz a transcrição da FS, mas por outro inibe a tradução da mesma, através da ação do NO produzido pelo IFN- $\gamma$ .

O NO ativa a ligação da IRP-1 ao IRE, bloqueando assim a tradução da FS (Hentze et al 2004). Monócitos tratados com IFN- $\gamma$  têm menor expressão do TfR, bloqueando assim a captação do Fe pelas células (Ludwiczek et al 2003).

A participação do IFN- $\gamma$  no processo inflamatório das doenças falciformes não está totalmente elucidado. O estudo feito por Taylor et al (1990) mostrou produção de IFN- $\gamma$  significativamente reduzida em pacientes com Síndromes Falciformes, tanto na fase estável como em crise quando comparados a controles sadios. Raghupathy et al (2000) determinaram níveis de diversas citocinas Th1 e Th2 no plasma e em sobrenadante de cultura de células mononucleares em 39 pacientes com doenças falciformes na fase estável da doença e alguns episódios de vaso-occlusão. Os níveis plasmáticos de IL-2 e IFN- $\gamma$  foram similares entre os pacientes e controles. Entretanto, a relação Th1/Th2 mostrou uma deficiência da resposta Th1 (imunidade mediada por células) nos pacientes falcêmicos, o que poderia explicar a predisposição às infecções bacterianas. Pathare et al (2004) relataram não haver diferença entre os níveis de IFN- $\gamma$  em 2 grupos de pacientes falciformes, na fase estável e em crise vaso-occlusiva, embora na fase estável os níveis fossem maiores em relação aos controles.

No nosso estudo, pacientes com doença falciforme não mostraram valores significativamente mais elevados de IFN- $\gamma$  do que os controles normais. Embora tenhamos utilizado no método de ELISA um reagente de alta sensibilidade, cerca de metade dos pacientes e dos controles não tiveram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , semelhantemente ao observado em outros estudos (Denz et al 1990, Raghupathy et al 2000).

Adicionalmente, não houve correlação entre IFN- $\gamma$  e os parâmetros relacionados com o metabolismo do Fe (dados não mostrados) nos pacientes que tiveram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , e a possível indução da expressão do RNAm da FS pelo IFN- $\gamma$  (Byrd & Horwitz 1993) não pode ser demonstrada. Os altos níveis de FS em parte dos

pacientes SS e SC podem ser conseqüentes a outros mecanismos além dos provenientes da ação do IFN- $\gamma$  sobre a sua síntese, como processos hemolíticos ou eventuais procedimentos transfusionais. Níveis elevados de FS também podem ser explicados pela atividade inflamatória presente nesses pacientes. Já foi demonstrado que vários marcadores da inflamação estão elevados tanto na fase estável como durante as crises em pacientes com anemia falciforme, como: proteína C-reativa (Makis et al 2006, Mohan et al 2005),  $\alpha$ -2 macroglobulina (Hedo et al 1993), IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e fibrinogênio (Hebbel et al 2004). Fica claro, entretanto, que outros estudos são necessários para melhor elucidar o exato papel do IFN- $\gamma$  na fisiopatogênese da doença falciforme.

Analizamos, então, os níveis de NP, produto dos macrófagos estimulados pelo IFN- $\gamma$ , cuja determinação pode estimar a extensão do stress oxidativo e a ativação do sistema imune (Murr et al 2002). Tem a vantagem de ser um elemento mais estável do que o IFN- $\gamma$  quando na circulação, facilitando sua determinação (Fuchs et al 1991). Níveis elevados de NP foram descritos em pacientes com doenças infecciosas (Fuchs et al 1993, Denz et al 1992, Grotto et al 1994), doenças auto-imunes (Samsonov et al 1995, Reibnegger et al 1986), em doenças neurodegenerativas (Lebhuber et al 1999), assim como em doenças cardiovasculares, como arteriosclerose (Redker et al 2000), cardiomiopatia e miocardite crônica (Samsonov et al 1992).

Em doenças tumorais malignas a elevação dos níveis de NP depende do tipo de tumor, estando elevados em cerca de 90% das neoplasias hematológicas e em 20% dos tumores de mama e melanoma (Reibnegger et al 1991). Outro fator que interfere no grau de elevação dos níveis de NP seria o estágio do tumor (Wachter et al 1989) e a agressividade do tumor, o que confere um valor prognóstico à NP, já que respostas celulares mais intensas contra tumores mais agressivos levariam a níveis mais elevados de NP (Murr et al 2002).

Nos processos vasculares, níveis elevados de NP além de sugestivos da ativação dos macrófagos, seriam indicativos da atividade inflamatória crônica (Schumacker et al 1997, Anwaar et al 1999). Os valores séricos de NP foram significativamente mais elevados nos pacientes com doenças falciformes do que nos

controles e a elevação da NP poderia ser interpretada pela presença de processos de microobstruções crônicas presentes mesmo durante a fase “estável” da doença. Estudo com animais transgênicos submetidos à hipóxia mostrou a presença de resposta inflamatória vascular, migração e adesão leucocitárias, seguidas da produção local de  $H_2O_2$  quando do restabelecimento da tensão de oxigênio nos tecidos isquêmicos (Kaul & Hebbel 2000). Nos pacientes com doença falciforme os episódios repetidos de isquemia localizada e reperfusão podem dar início a um estado permanente de inflamação crônica de baixo grau, mesmo na fase “estável” (Orah 2000). A liberação de NP por macrófagos ativados demonstrada durante episódios de isquemia cerebral (Anwaar et al 1999) poderia ocorrer semelhantemente durante os episódios de oclusão e lesão vasculares que ocorrem na doença falciforme, explicando os resultados por nós encontrados. Vale lembrar que outras citocinas são capazes de induzir a liberação de  $INF-\gamma$  por células T e, conseqüentemente, aumentariam a liberação de NP, como IL-2,  $TNF-\alpha$  e GM-CSF (Brown et al 1989, Marth et al 1994).

A correlação entre NP e a eritropoiese nos pacientes falciformes não foi por nós demonstrada, diferentemente do relatado em outras doenças crônicas, como infecção pelo HIV (Fuchs et al 1991), artrite reumatóide (Reibnegger et al 1986) e neoplasias hematológicas (Denz et al 1990). Da mesma forma a ação da NP sobre o metabolismo do Fe demonstrada em doenças inflamatórias crônicas (Fuchs et al 1991, Weiss et al 1988), não foi observada nas doenças falciformes.

O conjunto de dados por nós apresentados nos permite sugerir que pacientes com anemia falciforme, mesmo durante a fase “estável” da doença, apresentam um certo grau de ativação do sistema monócito/macrófago, representados pelos níveis elevados de NP, o que deve contribuir para o estado de inflamação crônica que esses pacientes apresentam. Pudemos observar também que, aparentemente, a IL-3, o  $IFN-\gamma$  e a NP não têm influência sobre o metabolismo do Fe nas hemoglobinopatias estudadas. Nossos dados corroboram também o conceito que a IL-3 está interrelacionada com a síntese de Hb F nos pacientes com doenças falciformes.

## *7- CONCLUSÕES*

- 1- Pacientes com anemia falciforme e hemoglobinopatia SC apresentaram níveis elevados de IL-3. A correlação entre IL-3 e níveis de Hb total e Hb F sugere a ação da IL-3 como estimulante da eritropoiese.
- 2- Não foi observada uma elevação dos níveis de INF- $\gamma$  nos pacientes com doenças falciformes.
- 3- Aparentemente a IL-3, o IFN- $\gamma$  e a NP não tem influência sobre o metabolismo do Fe nesses pacientes.
- 4- Dosagens séricas elevadas de NP nos grupos SS e SC sugerem um certo grau de ativação do sistema monócito/macrófago, mesmo na fase “estável” da doença em concordância com a condição de inflamação crônica atualmente reconhecida na fisiopatologia da Doença Falciforme.

## *8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Edts. Cellular and molecular immunology, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994.

Abshire TC. The anemia of inflammation. *Pediatr Clin North Am* 1996, 43: 623-637.

Anwaar I, Gottsäter A, Lindgärde F, Mattiasson I. Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelial during follow-up after acute cerebral ischemia. *Angiology* 1999, 50: 1-8.

Beguín Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. *Haematologica* 1992, 77: 1-10.

Belcher JD, Marker PH, Geiger P, Girotti AW, Steinberg MH, Hebbel RP, Vercellotti GM. Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 1999, 133: 605-612.

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; 96:2451-2459.

Berdowska A & Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther* 2001, 26: 319-329.

Beutler E. The sickle cell diseases and related disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*, 6<sup>a</sup> Ed. USA: Mc Graw Hill, 581, 2001.

Borba R, Lima CSP, Grotto HZW. Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. *J Clin Lab Anal*, 2003 17 (2): 66-72.

Bourgeade MF, Silbermann F, Kühn L, Testa U, Peschle C, Memet S, Thang MN, Besancon F. Post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA by INF- $\gamma$ . *Nucleic Acids Res* 1992, 20: 2997-3003.

Brock JH & Mulero V. Cellular and molecular aspects of iron and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society* 2000, 59:537-540.

Brown RR, Lee CM, Kohler PC, Hank JA, Storer BE, Sondel PM. Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 1989, 49,4941-4944.

Byrd T & Horwitz MA. Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear macrophages: coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. *J Clin Invest* 1993, 91: 969-976.

Chan CPY, Choi JWY, Cao KY, Wang M, Gao Y, Zhou DH, Di B, Xu HF, Leung MF, Bergmann A, Lehmann M, Nie YM, Cautherley GWH, Fuchs D, Renneberg R, Zheng BJ. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. *Journal of Infection* 2006, 53:152-158.

Chies JÁ, Nardi NB. Sick cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 2001, 57: 46-50.

Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum transferrin receptor. *Ann Rev Med* 1993, 63-74.

Croizat H. Early circulating erythroid progenitors (BFU-E) in sickle cell anemia. *Experientia*, 1993, 49 (2): 118-25.

Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* 1994, 87: 592-597.

Croizat H & Nagel R. Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1999, 60: 105-115.

Denz HA, Fuchs D, Huber. Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *Eur J Haematol* 1990, 44: 186-189.

Denz H, Huber DH, Landmann R, Orth B, Wachter H, Fuchs D. Association between the activation of macrophages, changes of iron metabolism and the degree of anaemia in patients with malignant disorders. *Eur J Haematol* 1992, 48: 244-248.

Dias-Da-Motta P, Arruda VR, Muscara MN, Saad ST, De Nucci G, Costa FF, Condino-Neto A. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anemia. *Br J Haematol* 1996, 93: 333-340.

Di Nuzzo DV, Fonseca SF. Sick cell disease and infection. *J Pediatr* 2004, 80 (5): 347-54.

Duits AJ, Rojer RA, Endt T van, Mac Gillavry MR, Cate H tem, Brandjes DPM, Schnog JB. Erythropoiesis and serum sVCAM-1 levels in adults with sickle cell disease. *Ann Hematol* 2003, 82:171-174.

Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes R, Cook J. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992, 19: 385-390.

Frenette PS. Sickle Cell Vasoocclusion: Heterotypic, Multicellular Aggregations Driven by Leukocyte Adhesion. *Microcirculation* 2004, 11(2):167-177.

Fuchs D, Reibnegger G, Werner ER, Vinazzer H, Wachter H. Low haemoglobin in haemophilia children is associated with chronic immune activation. *Acta Haematol* 1991, 85: 62-65.

Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin , biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 1993, 101: 1-6.

Gladwin MT, Lottenberg R, Walters M. Sickle cell disease: Advances in pathogenesis and management. *Hematology* 2005.

Grotto HZW, Costa FF, Carneiro M, Galiza Neto GC. Serum neopterin in patients with Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994, 88: 75.

Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 1997, 100 (11 Supp 1): S83-6.

Hebbel RP. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 2000, 342: 1910-1912.

Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004, 11(2):129-51.

Hedo CC, Akenova YA, Okpala IE, Durojaiye AO, Salimonu LS. Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. *J Intern Med* 1993, 233(6):467-70.

Hentze MW, Muckenthaler UM, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004, 117 (3): 285-297.

Hoffbrand AV, Pettit JE. Genetic Disorders of haemoglobin. In: Hoffbrand AV, Pettit JE. Essential Haematology, 3<sup>a</sup> Ed. London: Blackwell Science, 71, 1995.

Huber CH, Batchelor JR, Fuchs D. Immune response-associated production of neopterin. J Exper Med 1984, 160: 310-316.

Kaul DK & Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. J Clin Invest 2000, 106: 411-420.

Leblhuber F, Walli J, Demel U, Tilz GP, Widner B, Fuchs D. Increased serum neopterin concentrations in patients with Alzheimer's disease. Clin Chem Lab Med. 1999, 37(4): 429-31.

Lhee HY, Kim H, Joo KJ, Jung SS, Lee KB. The clinical significance of serum and urinary neopterin levels in several renal diseases. J Korean Med Sci 2006, 21:678-82.

Litos M, Sarris I, Bewley S, Seed P, Okpala I, Ntin EO. White blood cell count as a predictor of severity of sickle cell disease during pregnancy. European J of Obs & Gin and Repr Biology 2006.

Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. Blood 2003, 101 (10): 4148-4154.

Maier-Redelsperger M, Noguchi CT, de Montalembert M. Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted hemoglobin S polymerization in sickle cell disease in the first two years of life: Parisian prospective study on sickle cell disease. Blood 1994, 84: 3182-3188.

Makis AC, Hatzimichael EC, Stebbing J, Bourantas KL. C-reactive protein and vascular cell adhesion molecule-1 as markers of severity in sickle cell disease. Arch Intern Med 2006 Feb 13;166(3):366-8.

Marcus SJ & Ware RE. Physiologic decline in fetal hemoglobin parameters in infants with sickle cell disease: implications for pharmacological intervention. J Pediatr/Oncol 1999, 21: 407-411.

Marth C, Weiss G, Koza A, Reibnegger G, Daxenbichler G, Zeimet AG, Fuchs D, Wachter H, Dapunt O. Increased production of immune activation marker neopterin by colony-stimulating factors in gynecological cancer patients. Int J Cancer 1994, 1;58(1):20-3.

- Means RTJr, Advances in the anemia of chronic disease. *Int J Hematol*1999, 7-12.
- Melichar B, Solichová D, Freedmans RS. Neopterin as an indicator of immune activation an prognosis in patients with gynecological malignancies. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16:240-252.
- Miller BA, Olivieri N, Hope SM, Faller DV, Perrine SP. Interferon-gamma modulates fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia and thalassemia. *J Interferon Res* 1990, 10: 357-366.
- Mohan JS, Lip GY, Wright J, Bareford D, Blann AD. Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005, 16(3):209-14.
- Montes RAO, Eckman JR, Hsu LL, Wick TM. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: Role of shear stress in propagation of vasoocclusion. *Am Journal of Hematology* 2002, 70:216-227.
- Müller TF, Vogl M, Neumann MC, Lange H, Grimm M, Müller MM. Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation *Clin Chim Acta* 1998, 276: 63-74.
- Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metabolism* 2002, 175-187.
- Oettl K, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Grammer T, Fuchs D, Reibnegger G. Formation of oxygen radicals in solutions of 7,8-dihydroneopterin. *Biochem Biophys Res Communicat* 1999, 264: 262-267.
- Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. *Blood Reviews* 2004, 18: 65-73.
- Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(1):40-4.
- Orah SP, Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *The American Society for Clinical Investigation* 2000, 106 (3): 337-338.

- Pagel H, Fandrey J, Schobesberger W, Fuchs D, Jelkmann W. Effects of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on hypoxia-induced renal erythropoietin production. *Eur J Haematol* 1999, 62: 341-345.
- Pathare A, Kindi AS, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology* 2003, 8 (5): 329-37.
- Pathare A, Kindi AS, Alnaqdy AA, Daar S, Macaulay HK, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am Journal of Hematology* 2004, 77: 323-328.
- Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest* 2000, 106: 337-338.
- Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(7):2531-6.
- Ponka P & Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999, 31:1111-1137.
- Quesenberry PJ, Colvin GA. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*, 6<sup>a</sup> Ed. USA: Mc Graw Hill, 581, 2001.
- Raghupathy R, Haider MZ, Azizieh F, Abdelsalam R, D'Souza TM, Adekile AD. Th1 and Th2 cytokines profiles in sickle cell disease. *Acta Haematol* 2000, 103: 197-202.
- Ramalho AS. As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil. *Revista Brasileira de Genética*. Ribeirão Preto, 1986.
- Reibnegger G, Egg D, Fuchs D et al. Urinary neopterin reflects clinical activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthrit Rheum* 1986, 29: 1063-1070.
- Reibnegger G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev*. 1991; 15(6):483-90.
- Reiter CD, Wang X, Santos JET, Hogg N, Cannon RO, Schechter NA, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine* 2002, 8: 12.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000, 23; 342(12):836-43.

Samsonov MY, Tilz GP, Egorova O, Reibnegger G, Balabanova RM, Nassonov EL, Nassonova VA, Wachter H, Fuchs D. Serum soluble markers of immune activation and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995, 4,1:29-32.

Samsonov M, Fuchs D, Reibnegger G, Belenkov JN, Nassonov EL, Wachter H. Patterns of serological markers for cellular immune activation in patients with dilated cardiomyopathy and chronic myocarditis. *Clin Chem* 1992, 38(5):678-80.

Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006, 27: 204-210.

Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1997, 30: 703-707.

Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* 1999, 91: 619-624.

Taylor SC, Shacks SJ, Villican SM, Olivares J, Dinkins GA. Interferon production in sickle cell disease. *Lymphokine Res* 1990, 9: 415-423.

Umemura T, Khatti AA, Donahue RE, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Effects of Interleukin-3 and Erythropoietin in Vivo Erythropoiesis and F-cell formation in primates. *Blood* 1989, 74:1571-1576.

Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 1989, 27: 81-141.

Walter PB, Fung EB, Killilea DW, Jiang Q, Hudes M, Madden J, Porter J, Evans P, Vichinsky E, Harmatz P. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with -thalassaemia or sickle cell disease. *Br J of Haematology* 2006, 135:254.

Weiss G. Iron and anemia of chronic disease. *Kidney Int* 1999, 55: S-12-S-17.

- Weiss G, Bogdan C, HentzeMW. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 1997, 158: 420-425.
- Weiss G, Fuchs D, Hausen A. Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS Letters* 1993, 321: 89-92.
- Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobersberger W, Fuchs D. Immune response and iron metabolism. *Brit J Anaesth* 1998, 81: 6-9.
- Weiss G, Willeit J, Kiechl S. Increased concentrations of neopterin in carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1994, 106: 263-271.
- Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1 and T 24 cells. *J Biol Chem* 1990, 265: 3189-3192.
- Woorwood M. Serum transferrin receptor assays and their application. *Ann Clin Biochem* 2002, 39: 221-230.
- Wun T. The role of inflammation and leukocytes in the pathogenesis of sickle cell disease; haemoglobinopathy. *Hematol* 2001, 5: 403-412.

## ***9- ANEXOS***

## ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Nome do projeto: “Ação de citocinas na hematopoiese em pacientes com Doenças Falciformes”**

Responsável pela condução da pesquisa: **Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto**

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

No. H.C.: \_\_\_\_\_

Esse projeto de pesquisa tem como justificativa e objetivo avaliar a relação entre substâncias liberadas durante o processo inflamatório e a produção de células vermelhas do sangue. Com isso, pretende-se conhecer melhor os mecanismos envolvidos no estabelecimento e evolução da anemia nos pacientes com Doenças falciformes.

O procedimento a que os voluntários serão submetidos ocorrerá durante a coleta de sangue para a realização dos exames requisitados pelo médico que o atendeu no Ambulatório de Hemoglobinopatias do HEMOCENTRO/UNICAMP. Na mesma punção de sangue venoso serão colhidos 2 tubos adicionais, em cujo material serão determinados níveis séricos de diversas citocinas e do receptor solúvel da transferrina.

Serão mantidos o sigilo e o caráter confidencial das informações, zelando-se pela privacidade do paciente e garantindo-se que sua identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

O paciente terá a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer tempo sem ter sua assistência médica comprometida.

O telefone do pesquisador para esclarecer eventuais dúvidas é (19) 3789 3273. O telefone da Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa para os casos de recursos ou reclamações dos pacientes é: (19) 3788.8936.

Campinas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2002.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Helena Zerlotti W. Grotto

**ANEXO 2-** Trabalho Publicado pela revista Journal of Clinical Laboratory Analysis  
20:75-79, 2006

## High Levels of Neopterin and Interleukin-3 in Sickle Cell Disease Patients

L. Rodrigues,<sup>1</sup> F.F. Costa,<sup>2</sup> S.T.O. Saad,<sup>2</sup> and H.Z.W. Grotto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>2</sup>Center of Hemotherapy and Hematology, State University of Campinas, Campinas, Brazil

Sickle cell disease (SCD) is recognized as a chronic inflammatory condition. Cytokines are released in response to stress or pathological situations, and influence hematopoiesis. The aim of this study was to evaluate interleukin-3 (IL-3), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and neopterin (NP) levels in steady-state patients with sickle cell anemia (SS) ( $n = 35$ ) and SC hemoglobinopathy ( $n = 15$ ) in order to verify the possible action of those cytokines and NP on iron metabolism and hematopoiesis. Serum IL-3 concentration was higher in SS and SC groups than in controls, whereas IFN- $\gamma$  levels did not differ among groups. SS patients presenting hemoglobin fetal (HbF)  $\geq 8.5\%$  had significantly higher IL-3 levels than those with HbF  $< 8.5\%$  ( $P = 0.0338$ ). No correlation was observed among inflammatory and

iron metabolism parameters. Significant correlations were observed between IL-3 and Hb levels ( $r = 0.4633$ ,  $P = 0.0457$ ), and IL-3 and HbF levels ( $r = 0.6011$ ,  $P = 0.0065$ ). A negative correlation was observed between IL-3 and reticulocyte counting ( $r = -0.4632$ ,  $P = 0.0457$ ) only in the SS group. NP levels were significantly higher in the SS and SC groups than in controls, but did not differ between SS and SC. No correlation was observed between NP and iron metabolism parameters. These data suggest that IL-3 stimulates hematopoiesis, and that SS patients, even in steady state, have macrophage/monocyte activation (represented by high levels of NP) that probably contributes to their chronic inflammatory condition. *J. Clin. Lab. Anal.* 20:75–79, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** cytokines; hemoglobinopathy; hemoglobin S; sickle cell anemia; hematopoiesis; fetal hemoglobin; steady state

### INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) manifestations are due to the substitution of a nucleotide base in codon 6 of the beta-globin gene. Red cells containing Hb S become rigid and are unable to pass through small arteries and capillaries. Vasoocclusive crises associated with severe infections are frequent, and currently both immune and inflammatory processes are considered to be closely associated with clinical manifestations in SCD patients (1–3). White blood cells contribute to vasoocclusion, stimulating the vascular endothelium to increase the expression of ligands for adhesion molecules. Obstruction of the lumen causes tissue damage and inflammatory reactions (4).

Cytokines are released in response to stress or pathological conditions, and influence hematopoiesis by enhancing or inhibiting cellular differentiation and proliferation. For instance, stem cell factor (SCF) and interleukins 3 and 7 (IL-3 and IL-7) stimulate hemato-

poiesis, and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) are inhibitory factors of erythropoiesis (5). IFN- $\gamma$  released during an infectious or inflammatory process acts negatively on transferrin receptor synthesis, stimulates iron capture from circulation, and enhances mRNA ferritin expression. The reduced disposable iron leads to impaired hemoglobinization and anemia (6).

Neopterin (NP) is a metabolite of guanosine triphosphate and is produced by monocytes/macrophages stimulated by IFN- $\gamma$  (7). It is considered a useful

Grant sponsor: FAPESP; Grant number: 13801/7

\*Correspondence to: Helena Zerlotti Wolf Grotto, Departamento de Patologia Clínica/Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Caixa Postal 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

E-mail: grotto@fcm.unicamp.br

Received 22 July 2005; Accepted 16 September 2005

DOI 10.1002/jcla.20104

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

marker of immunological activation, and NP measurement has been used to predict transplant rejection and monitor infectious autoimmune disorders and renal diseases (reviewed in Ref. 8).

There is a decreasing in blood iron content during immune response. Supposed mechanisms involved in hypoferraemia, such as iron request for proliferation and differentiation of immune cells, and ferritin production stimulated by TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6, lead to a reduction in circulating iron. In addition, lower intracellular iron concentration increases the release of NP by monocytic cells stimulated by IFN- $\gamma$  (9). NP has an indirect inhibitory effect on erythropoiesis by decreasing erythropoietin mRNA levels (10).

Increased NP concentrations are observed in infectious diseases, malignancies, and autoimmune diseases (reviewed in Ref. 8). Previous studies showed an inverse correlation between NP levels and hemoglobin, and a positive correlation between NP and ferritin levels in patients with chronic diseases with accompanying anemia (11).

There is evidence that a chronic inflammation condition exists in SCD patients even in steady state (1). The aim of this study was to evaluate the cytokine and NP levels in SCD patients and investigate the possible relationship between the inflammatory process and erythropoiesis in sickle cell anemia (SS) and SC hemoglobinopathy patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

Fifty SCD patients (35 SS homozygous and 15 SC double heterozygous) who were seen at the Center of Hemotherapy and Hematology, State University of Campinas, SP, Brazil, in steady state (no acute complications) were studied. They ranged in age from 17 to 54 years (mean = 34 years) in the SS group, and from 14 to 48 years (mean = 30 years) in the SC group. Twenty-six healthy individuals (21–50 years old, mean = 35 years), without clinical and laboratory data concerning anemia or infection/inflammatory disease were selected as the control group. There was no significant difference in age and gender distribution among the studied groups (Kruskal-Wallis test). None of the patients were receiving hydroxyurea treatment or had received a blood transfusion during the 3 months prior to sample collection.

Informed consent was obtained from all individuals, consistent with the guidelines of the local ethics committee.

### **Laboratory Studies**

Blood samples were collected by venipuncture. Serum was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed. Complete blood

counts (CBCs) and reticulocyte counts were determined with the use of the Sysmex XE-2100 (Sysmex, Kobe, Japan). HbF measurement was obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC, Bio-Rad Variant; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Iron metabolism was assessed by serum iron (SI), total iron binding capacity (TIBC; Synermed International, Westfield, IN), and serum ferritin (SF; Elecsys; Roche Diagnostics, Germany) levels.

– For the erythropoiesis evaluation, soluble receptor of transferrin (sTfR) was detected by nephelometry (Dade Behring, Marburg, Germany), and erythropoietin (EPO) was detected by immunometric assay (Immulite EPO; DPC, Los Angeles, CA).

– Serum levels of cytokines and NP were measured using commercially available immunoassays kits: using IL-3 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), IFN- $\gamma$  (Pharmingen, San Diego, CA), and NP (IBL Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Germany). The kits used to measure IL-3 and IFN- $\gamma$  employed a high-sensitivity technique.

## **Statistical Analysis**

The Mann-Whitney test was used to compare two independent groups, and Kruskal-Wallis was used to compared three or more groups. Spearman's rank correlation was used in the correlation analyses. The data are presented as the median and range. Statistically significant differences were defined as comparisons resulting in  $P < 0.05$ . All of the calculations were made in the SAS System for Windows, version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## **RESULTS**

Our results showed that, as expected, anemia and hemolysis degrees were more severe in SS patients than in patients with SC hemoglobinopathy, according to Hb and reticulocyte values. Erythropoietic activity was evaluated by sTfR measurement and it was higher in SS patients than in the SC group, and both were higher compared to the control group (Table 1). A positive correlation between sTfR and reticulocyte counts was observed in SS patients ( $r = 0.4341$ ,  $P = 0.0091$ ). Regarding iron status, SS and SC patients showed SI and TIBC levels significantly lower than the control group, but serum ferritin values were higher in both groups compared to control individuals (Table 1).

Nineteen SS patients (54.2%), seven SC patients (46.6%), and 12 control individuals (46.1%) had detectable levels of serum IL-3. In those individuals

**TABLE 1. Hematological and iron status parameters in SS and SC patient groups, and control group (median and range)**

| Parameters              | Control group (C)<br>(n = 26) | SS group<br>(n = 35)                   | SC group<br>(n = 15)                   |
|-------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Hb (g/dL)               | 14.0<br>(12.0–17.3)           | 8.2 <sup>*,**</sup><br>(5.4–14.1)      | 12.0 <sup>*,**</sup><br>(9.5–14.1)     |
| Hb F (%)                | 1.05<br>(0.3–1.3)             | 6.3 <sup>*,**</sup><br>(0.7–22.0)      | 1.5 <sup>*,**</sup><br>(0.3–6.1)       |
| RTC ( $\times 10^9$ /L) | 43.2<br>(18.9–93.1)           | 246.8 <sup>*,**</sup><br>(131.5–606.2) | 108.9 <sup>*,**</sup><br>(63.9–201.3)  |
| WBC ( $\times 10^9$ /L) | 6.6<br>(3.3–11.5)             | 9.2 <sup>*,**</sup><br>(4.0–15.1)      | 7.9 <sup>*,**</sup><br>(3.1–12.6)      |
| sTfR (mg/L)             | 1.5<br>(0.9–3.1)              | 9.84 <sup>*,**</sup><br>(3.19–19.5)    | 3.58 <sup>*,**</sup><br>(2.25–6.01)    |
| SI ( $\mu$ g/dL)        | 84.0<br>(36.0–158.0)          | 58.0 <sup>*</sup><br>(25.0–145.0)      | 63.0 <sup>*</sup><br>(30.0–97.0)       |
| TIBC ( $\mu$ g/dL)      | 372.5<br>(291.0–493.0)        | 236.0 <sup>*,**</sup><br>(87.0–390.0)  | 329.0 <sup>*,**</sup><br>(192.0–449.0) |
| SF (ng/mL)              | 51.9<br>(13.0–252.6)          | 118.7 <sup>*</sup><br>(27.5–2385.0)    | 201.3 <sup>*</sup><br>(16.6–1773.0)    |
| EPO ( $\mu$ m/mL)       | 8.3<br>(4.2–17.2)             | 64.1 <sup>*,**</sup><br>(16.2–274.0)   | 27.5 <sup>*,**</sup><br>(12.2–5.3)     |

Hb, hemoglobin; Hb F, fetal hemoglobin; RTC, reticulocyte count; WBC, white blood cells; sTfR, soluble transferrin receptor; SI, serum iron; TIBC, total iron-binding capacity; SF, serum ferritin; EPO, erythropoietin.

\* $P < 0.05 \times C$ .

\*\* $P < 0.05$  SS  $\times$  SC groups.

serum IL-3 concentrations were statistically higher in the SS and SC groups compared to the control group ( $P = 0.0350$  and  $P = 0.0280$ , respectively), but not between the patient groups. NP levels were significantly increased in the SS and SC groups compared to controls ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0336$ , respectively). Between SS and SC patients there was no difference (Table 2). Positive significant correlations between IL-3 and Hb ( $r = 0.4633$ ,  $P = 0.0457$ ), and IL-3 and HbF ( $r = 0.6011$ ,  $P = 0.0065$ ) were observed, and a negative correlation between IL-3 and RTC ( $r = -0.4632$ ,  $P = 0.0457$ ) was observed in the SS group but not in the SC and control groups.

Twelve healthy controls (46.1%), 19 SS patients (54.2%), and seven SC patients (46.6%) had detectable levels of IFN- $\gamma$ , and the difference among groups was not significant (Table 2).

When SS patients were subdivided according to Hb F levels, 21 showed Hb F  $< 8.5\%$  (LHbFSS) and 14 had Hb F  $\leq 8.5\%$  (HHbFSS). Total Hb levels were lower in LHbFSS patients than in HHbFSS patients ( $P = 0.0116$ ). IL-3 concentrations were significantly higher in HHbFSS patients ( $P = 0.0338$ ) than in LHbFSS patients. IFN- $\gamma$ , NP, and sTfR levels did not differ between the groups (Table 3).

**TABLE 2. Cytokines and NP levels in control and patient groups (median and range)**

|                       | Control group (C)             | SS group                      | SC group                     | P value                                              |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|
| IL-3 (pg/mL)          | 17.3 (n = 12)<br>(3.10–116.4) | 46.6 (n = 19)<br>(11.5–296.0) | 67.3 (n = 7)<br>(12.2–145.0) | 0.0350 (SS $\times$ C)<br>0.0280 (SC $\times$ C)     |
| IFN- $\gamma$ (pg/mL) | 2.0 (n = 12)<br>(1.1–6.0)     | 2.5 (n = 19)<br>(1.0–22.0)    | 2.0 (n = 7)<br>(1.0–3.6)     | NS                                                   |
| NP (nmol/L)           | 3.95 (n = 26)<br>(2.2–7.5)    | 6.90 (n = 35)<br>(2.8–33.0)   | 5.9 (n = 15)<br>(2.5–8.9)    | $< 0.0001$ (SS $\times$ C)<br>0.0336 (SC $\times$ C) |

NP, neopterin; IL-3, interleukin 3; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; NS, not significant.

**TABLE 3. Hb, sTfR, IL-3, IFN- $\gamma$ , and NP levels in SS patient subgroups according to HbF percentage (median and range)**

|                       | HHbFSS<br>(n = 14)           | LHbFSS<br>(n = 21)             | P value |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|---------|
| Hb (g/dL)             | 8.6<br>(6.5–14.1)            | 7.1<br>(5.4–10.2)              | 0.0116  |
| NP (nmol/L)           | 6.2<br>(3.1–14.0)            | 7.0<br>(2.8–33.0)              | 0.3722  |
| sTfR (mg/L)           | 8.74<br>(3.19–19.5)          | 10.2<br>(6.93–15.6)            | 0.3206  |
| IL-3 (pg/mL)          | 74.7 (n = 9)<br>(11.5–296.0) | 32.6 (n = 10)<br>(14.4–103.10) | 0.0338  |
| IFN- $\gamma$ (pg/mL) | 2.0 (n = 6)<br>(1.1–16.7)    | 2.7 (n = 13)<br>(1.6–22.0)     | 0.40470 |

Hb, hemoglobin; NP, neopterin; sTfR, soluble transferrin receptor; IL-3, interleukin 3; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; HHbFSS, HbF  $\geq 8.5\%$ ; LHbFSS, Hb F  $< 8.5\%$ .

## DISCUSSION

The role of inflammation in the physiopathology of SCD has been the target of recent investigations (3,4,12). The rigid sickle erythrocyte interacts with leukocytes, platelets, plasma proteins, and blood vessel walls, reducing the blood flow and causing infarcts in different organs. Several molecules mediate leukocyte adhesion to the vascular endothelium, such as intercellular adhesion molecule (ICAM), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and L-selectin. Vasoocclusion causes ischemia, infarction, and pain. Vasoactive substances, interleukins, and highly reactive oxygen radicals are released from leukocytes, causing oxidative damage and increasing the inflammatory reaction (4).

IFN- $\gamma$  participation in inflammatory process in SCD is not completely elucidated. Raghupathy et al. (13) reported that IFN- $\gamma$  plasma levels are similar in SS patients and controls, and Taylor et al. (14) observed

lower IFN- $\gamma$  levels in steady- and crisis-state SCD patients. In another study elevated levels of IFN- $\gamma$  were observed in steady-state SCD patients compared to normal subjects, but there was no difference between steady- and crisis-state groups (15). In our study patients with SCD presented IFN- $\gamma$  levels similar to those in controls, in agreement with Raghupathy et al. (13). The great diversity of IFN- $\gamma$  level determinations in clinical studies is probably due to IFN- $\gamma$  instability and to the technical limitations of plasma detection by current assays.

Proinflammatory cytokine IFN- $\gamma$  seems to affect iron homeostasis by different mechanisms: IFN- $\gamma$  depresses TfR expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms, induces ferritin mRNA expression in macrophages. In contrast, it represses ferritin mRNA translation by nitric oxide action on IRP-IRE binding within the 5' untranslated mRNA region (reviewed in Ref. 6). According to our results, the lack of correlation between IFN- $\gamma$  levels and iron parameters in SS and SC patients with detectable serum IFN- $\gamma$  levels suggests that high levels of ferritin in SCD patients are due to the hemolysis process, which supplants the cytokine action. However, the exact role of IFN- $\gamma$  in hematopoiesis in SCD requires further studies for better elucidation.

Interestingly, values of NP, a product of macrophage/monocyte activation by IFN- $\gamma$ , were significantly higher in SS patients. NP measurement has an advantage over other immune system mediators because NP is biologically stable and has been studied as a marker associated with cell-mediated immunity in infectious, malignant, autoimmune, and chronic inflammatory diseases (reviewed in Ref. 8). NP plays physiological roles in inducing apoptosis (16) and enhancing the effect of hydrogen peroxide and chloramine and their toxicity against microorganisms (17).

No correlation between circulating IFN- $\gamma$  and NP levels was found in our study, in contrast to previous findings in infectious diseases and allograft recipients. NP measurement appears to be superior to IFN- $\gamma$  because it may reflect the effect of the synergism between other cytokines and IFN- $\gamma$  on the macrophage population. In addition, NP is biologically stable and easily quantified in human body fluids (reviewed in Ref. 9).

An association between increased NP levels and abnormalities of the hematopoietic systems has been described in patients with malignant and infectious diseases. An inverse correlation between Hb and NP levels was also observed, and NP was associated with abnormalities of iron metabolism (18,19). In our study no correlation between Hb and NP levels, or among NP and several iron parameters was observed, suggesting

that NP does not interfere in erythropoiesis and iron metabolism. Higher NP levels in SS patients are probably due to the chronic inflammatory process. It has been demonstrated that during intravascular hemolysis, the physical separation of hemoglobin from endothelium is disrupted, resulting in efficient nitric oxide scavenging and endothelial dysfunction (20). Activation of macrophages during vascular injury in SCD may lead to release of NP into the blood stream, as demonstrated in an acute episode of cerebral ischemia (21).

Croizat and Nagel (22) studied the participation of circulating cytokines in erythropoiesis in SCD. Stem cell factor (SCF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) were higher in LHbFSS than in HHbFSS, and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), an inhibitor cell growth, was lower in patients with low levels of HbF, indicating a permanent state of overall increased hematopoiesis in LHbFSS patients in response to higher erythropoiesis stress.

IL-3 is a multilineage stimulator that, in addition to acting with other growth factors, interacts with EPO to stimulate primitive erythroid stem cell (23). The stimulatory effect of IL-3 on erythropoiesis was demonstrated in our study, since IL-3 levels were significantly higher in SS and SC patients compared to controls. IL-3 control of hematopoiesis was determined to be more consistent by comparing IL-3 values in SS subgroups with different levels of HbF: elevated IL-3 concentrations were observed in HHbFSS compared to LHbFSS, in accordance with previously reported results. Studies have shown that levels of IL-3 in SS patients are specifically linked to the degree of hematopoietic stress, which is lower in HHbFSS patients due to the inhibitory effect of HbF on the polymerization of deoxy HbS (22,24).

The lack of correlation between EPO and Hb, and between EPO and HbF may be a consequence of a complex association of variables involved in anemia in SCD, such as renal damage, fault in folic acid supplement and presence of infection process. All of those variables may contribute to a relative reduction of EPO levels for the degree of anemia (25).

In conclusion, this study demonstrates the influence of IL-3, IFN- $\gamma$ , and NP on iron metabolism in SCD patients. The observed correlation between interleukin and Hb/HbF levels suggests that IL-3 has a positive action on hematopoiesis in SCD patients. As far as we know, this is the first study to evaluate NP in SCD. Our data indicate that SS patients, even in steady state, present a macrophage/monocyte activation, represented by high levels of NP, that probably contributes to the chronic inflammatory condition of SS patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Maria Heloísa Souza Lima Blotta for offering the use of her laboratory, and Prof. Ronei Mamoni for providing technical assistance.

## REFERENCES

- Chies JAB, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypoth* 2001;57:46–50.
- Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest* 2000;106:337–338.
- Pathare A, Kindi AS, Daar K, Dennilson D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology* 2003;8:329–337.
- Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease—a red cell disorder. *Blood Rev* 2004;18:65–73.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. editors. *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: WB Saunders Co., 1994.
- Weiss G. Iron and anemia of chronic disease. *Kidney Int* 1999;55: S12–S17.
- Huber CH, Batchelor JR, Fuchs D, et al. Immune response-associated production of neopterin. *J Exp Med* 1984;160:310–316.
- Berdowska A, Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Ther* 2001;26:318–329.
- Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:1–6.
- Pagel H, Fandrey J, Schobesberger W, Fuchs D, Jelkmann W. Effects of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on hypoxia-induced renal erythropoietin production. *Eur J Haematol* 1999;62:341–345.
- Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobesberger W, Fuchs D. Immune response and iron metabolism. *Br J Anaesth* 1998;81:6–9.
- Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 2000;106:411–420.
- 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;103:197–202.
- Taylor SC, Shacks SJ, Villicana SM, Olivares J, Dinkins GA. Interferon production in sickle cell disease. *Lymphokine Res* 1990; 9:415–423.
- Pathare A, Kindi AS, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol* 2004;77:323–328.
- Oetl K, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Grammer T, Fuchs D, Reibnegger G. Formation of oxygen radicals in solutions of 7,8-dihydroneopterin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264: 262–267.
- Weiss G, Fuchs D, Hausen A, et al. Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS Lett* 1993; 321:89–92.
- Denz H, Hubber DH, Landmann R, Orth B, Wachter H, Fuchs D. Association between the activation of macrophages, changes of iron metabolism and the degree of anaemia in patients with malignant disorders. *Eur J Haematol* 1992;48:244–248.
- Fuchs D, Reibnegger G, Werner ER, Vinazer H, Wachter H. Low haemoglobin in haemophilia children is associated with chronic immune activation. *Acta Haematol* 1991;85:62–65.
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002;8:1383–1389.
- Anwaar I, Gottsäter A, Lindgärde F, Mattiasson I. Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelin during follow-up after acute cerebral ischemia. *Angiology* 1999;50:1–8.
- Croizat H, Nagel RL. Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 1999;60: 105–115.
- Quesenberry PJ, Colvin GA. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Hematology*. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001. p 153–174.
- Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* 1994;87:592–597.
- Sherwood JB, Goldwasser E, Chilcote R, Carmichael LD, Nagel RL. Sickle cell anemia patients have low erythropoietic levels for their degree of anemia. *Blood* 1986;67:46–49.

**Tabela 4 - Valores de referência do grupo de controles normais.**

| num. | Id | Sex | BI<br>(mg/dL) | BT<br>(mg/dL) | Hb F<br>% | Hb<br>(g/dL) | MCV<br>(fL) | MHC<br>(pg) | RTC<br>% | RTC#<br>(x106) | WBC<br>(x 103/uL) | sTfR<br>(mg/l) | FS<br>(ng/ml) | Fe<br>(µg/dL) | TIBC<br>(U/dL) | NP<br>(nmol/L) | IL3<br>(pg/mL) | INFγ<br>(pg/mL) | EPO<br>(mU/mL) |
|------|----|-----|---------------|---------------|-----------|--------------|-------------|-------------|----------|----------------|-------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| 501  | 44 | F   | 0,20          | 0,30          | 0,40      | 13,30        | 92,70       | 32,40       | 1,60     | 64,90          | 4,80              | 1,20           | 24,70         | 41,00         | 394,00         | 3,00           | 100,00         | ***             | 6,2            |
| 503  | 46 | F   | 0,70          | 0,80          | 1,30      | 13,60        | 94,10       | 32,20       | 2,10     | 89,30          | 6,00              | 1,10           | 132,80        | 101,00        | 416,00         | 3,80           | ***            | 1,8             | 11,1           |
| 505  | 21 | F   | 0,20          | 0,30          | 0,30      | 12,00        | 91,50       | 31,10       | 1,20     | 44,40          | 6,00              | 1,90           | 17,80         | 36,00         | 359,00         | 4,00           | ***            | ***             | 9,2            |
| 506  | 33 | F   | 0,30          | 0,40          | 0,50      | 14,00        | 91,40       | 31,80       | 0,60     | 28,20          | 7,20              | 1,80           | 66,40         | 112,00        | 491,00         | 3,80           | ***            | ***             | 12,4           |
| 507  | 32 | M   | 0,60          | 0,70          | 1,20      | 15,90        | 88,20       | 31,20       | 1,00     | 51,90          | 6,90              | 1,30           | 252,60        | 68,00         | 363,00         | 5,20           | ***            | 2,2             | 6,9            |
| 508  | 27 | F   | 0,20          | 0,30          | 0,70      | 13,20        | 88,90       | 31,30       | 1,10     | 46,00          | 11,50             | 1,40           | 26,50         | 78,00         | 381,00         | 3,20           | ***            | 2,0             | 6,5            |
| 509  | 25 | F   | 1,60          | 2,20          | 1,20      | 12,90        | 92,80       | 31,20       | 0,50     | 21,90          | 9,70              | 1,50           | 50,10         | 101,00        | 350,00         | 2,20           | ***            | 6,0             | 9,9            |
| 510  | 31 | F   | 0,30          | 0,40          | 0,40      | 13,00        | 85,20       | 29,10       | 0,80     | 36,20          | 8,60              | 1,70           | 18,40         | 119,00        | 367,00         | 4,20           | 17,30          | 1,4             | 6,8            |
| 511  | 50 | F   | 0,40          | 0,50          | 0,50      | 14,60        | 89,00       | 31,40       | 1,40     | 62,80          | 4,90              | 1,80           | 212,10        | 69,00         | 384,00         | 3,90           | 116,40         | 2,3             | 6,6            |
| 513  | 24 | M   | 0,50          | 0,70          | 1,00      | 14,30        | 90,30       | 30,80       | 0,80     | 35,30          | 3,30              | 1,60           | 113,50        | 133,00        | 388,00         | 3,20           | 113,40         | 1,1             | 6,6            |
| 516  | 22 | F   | 0,30          | 0,40          | 0,90      | 13,60        | 89,20       | 31,10       | 1,60     | 67,70          | 5,40              | 1,30           | 37,40         | 119,00        | 493,00         | 3,80           | ***            | 2,0             | 10,0           |
| 517  | 39 | M   | 0,40          | 0,50          | 0,30      | 15,50        | 89,10       | 31,80       | 0,60     | 29,20          | 5,00              | 1,20           | 51,80         | 99,00         | 379,00         | 3,40           | ***            | ***             | 8,2            |
| 518  | 46 | F   | 0,50          | 0,60          | 1,20      | 14,50        | 86,30       | 30,60       | 1,10     | 53,60          | 4,80              | 1,20           | 35,80         | 85,00         | 347,00         | 3,40           | ***            | ***             | 7,4            |
| 519  | 40 | M   | 1,00          | 1,30          | 1,20      | 15,90        | 88,70       | 30,90       | 1,30     | 64,80          | 7,90              | 1,20           | 178,70        | 112,00        | 291,00         | 5,30           | ***            | ***             | 7,7            |
| 520  | 32 | M   | 0,80          | 1,00          | 0,40      | 16,00        | 89,80       | 32,70       | 0,90     | 42,10          | 5,40              | 2,90           | 222,30        | 82,00         | 306,00         | 4,00           | ***            | 3,4             | 8,60           |
| 521  | 41 | F   | 0,40          | 0,40          | 0,30      | 14,00        | 88,90       | 30,60       | 0,50     | 21,50          | 8,30              | 1,10           | 80,70         | 82,00         | 337,00         | 4,00           | 17,30          | 1,1             | 8,30           |
| 522  | 42 | M   | 1,00          | 1,30          | 1,21      | 17,30        | 90,60       | 33,10       | 1,80     | 93,10          | 6,70              | 1,90           | 138,10        | 106,00        | 400,00         | 4,70           | 7,50           | ***             | 17,00          |
| 523  | 33 | F   | 0,50          | 0,70          | 0,70      | 13,70        | 87,40       | 30,20       | 0,60     | 28,10          | 4,70              | 1,70           | 41,80         | 96,00         | 330,00         | 7,50           | 3,10           | ***             | 12,70          |
| 525  | 50 | F   | 0,40          | 0,50          | 1,00      | 13,60        | 89,50       | 30,90       | 1,20     | 50,60          | 6,50              | 1,60           | 47,60         | 67,00         | 358,00         | 3,40           | 13,30          | ***             | 9,00           |
| 526  | 38 | F   | 0,30          | 0,40          | 1,10      | 12,90        | 90,90       | 31,70       | 0,70     | 28,90          | 9,30              | 1,40           | 66,40         | 158,00        | 442,00         | 4,50           | ***            | ***             | 6,30           |
| 527  | 34 | F   | 0,40          | 0,40          | 1,30      | 12,90        | 94,90       | 32,60       | 1,00     | 40,80          | 8,70              | 0,90           | 59,60         | 72,00         | 291,00         | 4,10           | ***            | 1,10            | 4,20           |
| 528  | 46 | F   | 0,60          | 0,70          | 1,20      | 13,30        | 89,50       | 31,00       | 0,80     | 35,20          | 5,30              | 1,50           | 38,90         | 68,00         | 390,00         | 6,80           | ***            | 5,10            | 9,20           |
| 529  | 26 | M   | 0,50          | 0,70          | 1,25      | 16,10        | 87,40       | 30,20       | 0,60     | 32,00          | 6,90              | 3,10           | 52,00         | 84,00         | 319,00         | 7,50           | 17,70          | ***             | XXX            |
| 531  | 23 | F   | 0,50          | 0,70          | 1,27      | 14,10        | 87,70       | 29,80       | 0,40     | 18,90          | 7,50              | 1,30           | 13,00         | 84,00         | 378,00         | 3,80           | 20,60          | ***             | 8,70           |
| 532  | 33 | F   | 0,50          | 0,60          | 1,26      | 14,50        | 88,40       | 29,60       | 1,30     | 62,20          | 6,90              | 1,70           | 22,70         | 76,00         | 381,00         | 3,60           | 8,90           | ***             | 5,00           |
| 533  | 43 | M   | 0,40          | 0,50          | 1,26      | 16,60        | 90,30       | 30,90       | 1,00     | 55,40          | 5,70              | 3,00           | 142,00        | 61,00         | 340,00         | 5,10           | 16,20          | ***             | 17,20          |

**BI:** Bilirrubina Indireta (< ou = 0,8 mg/dL)\*

**BT:** Bilirrubina Total (< ou = 1,0 mg/dL)

**Hb F:** Hemoglobina Fetal (< ou = 2%)

**Hb:** hemoglobina (14,0-18,0 g/dL para homens e 12,0-16,0 g/dL para mulheres)

**MCV:** volume celular médio (80-96 fL para homens 27-32 fL para mulheres)

**MCH:** hemoglobina celular média (27-32 pg)

**RTC:** reticulócitos (37,0-135,0 x 10<sup>6</sup>/uL)

**RTC#:** reticulócitos absolutos (50-100x10<sup>9</sup>/L)

**WBC:** Leucócitos (4,0-10,0 x 10<sup>3</sup>/uL)

**sTfR:** receptor solúvel de transferrina (0,83-1,76 mg/L)

**FS:** Ferritina sérica (30-400 ng/mL para homens e 13-150 ng/mL para mulheres)

**Fe:** Ferro sérico (40-160 µg/dL para homens e 30-160 µg/dL para mulheres)

**TIBC:** Capacidade total de saturação de ferro (250-400 U/dL)

**NP:** neopterina (<10 nmol/L)

**IL3:** interleucina 3 (< 31,2 pg/nL)

**INFγ:** interferon γ (<5,5 pg/mL)

**EPO:** eritropoietina (2,6-34 mU/mL)

\*\*\* Valores não detectáveis

\* Valores em parêntesis correspondem aos valores de referência.

**XXX** Não quantificado

**Tabela 5 - Valores encontrados nas análises dos pacientes SC.**

| num  |    |     | BI      | BT      | Hb F | HB     | MCV   | MCH   | RTC  | #RTC      | WBC       | sTfR   | FS       | Fe      | TIBC   | NP       | IL3    | INFy    | EPO     |
|------|----|-----|---------|---------|------|--------|-------|-------|------|-----------|-----------|--------|----------|---------|--------|----------|--------|---------|---------|
|      | Id | Sex | (mg/dL) | (mg/dL) | (%)  | (g/dL) | (fL)  | (pg)  | %    | (x106/uL) | (x103/uL) | (mg/L) | (ng/ml)  | (µg/dL) | (U/dL) | (nmol/L) | pg/mol | (pg/mL) | (mU/mL) |
| 9013 | 41 | F   | 1,10    | 1,40    | 3,60 | 9,50   | 86,50 | 29,20 | 4,16 | 135,20    | 12,04     | 3,04   | 758,40   | 81,00   | 350,00 | 2,50     | 26,10  | 1,40    | 27,50   |
| 9015 | 29 | M   | 1,00    | 1,40    | 1,50 | 10,90  | 80,10 | 27,50 | 5,07 | 201,30    | 8,85      | 6,01   | 236,40   | 71,00   | 290,00 | 8,00     | 145,00 | ***     | 36,70   |
| 9018 | 32 | F   | 1,10    | 1,50    | 0,92 | 12,50  | 77,20 | 27,40 | 1,84 | 83,90     | 11,13     | 3,18   | 201,30   | 72,00   | 284,00 | 5,90     | ***    | ***     | 23,60   |
| 9019 | 29 | M   | 1,20    | 1,70    | 0,60 | 13,60  | 75,60 | 27,70 | 3,55 | 174,30    | 8,51      | 3,20   | 217,80   | 88,00   | 219,00 | 3,90     | ***    | ***     | 13,60   |
| 9020 | 29 | M   | 1,50    | 2,10    | 0,30 | 13,50  | 68,40 | 24,50 | 1,44 | 79,30     | 3,18      | 4,05   | 154,10   | 30,00   | 192,00 | 7,50     | 20,20  | ***     | 23,90   |
| 9025 | 26 | M   | 1,20    | 1,60    | 2,00 | 10,00  | 82,50 | 29,20 | 4,36 | 149,50    | 12,64     | 4,49   | 1.773,00 | 97,00   | 385,00 | 8,90     | 86,60  | 2,30    | 27,10   |
| 9029 | 36 | M   | 0,90    | 1,40    | 0,50 | 11,60  | 78,70 | 28,10 | 3,24 | 133,80    | 4,03      | 4,08   | 16,66    | 51,00   | 362,00 | 5,70     | 67,30  | 2,00    | 54,40   |
| 9031 | 27 | F   | 0,70    | 1,00    | 3,10 | 11,10  | 85,40 | 30,60 | 1,98 | 71,90     | 5,51      | 3,46   | 20,87    | 50,00   | 329,00 | 5,10     | ***    | ***     | 95,30   |
| 9034 | 48 | F   | 0,80    | 1,10    | 0,60 | 10,70  | 83,90 | 30,10 | 3,74 | 132,80    | 8,85      | 2,77   | 690,60   | 59,00   | 353,00 | 8,10     | ***    | 1,40    | 37,20   |
| 9058 | 25 | F   | 0,30    | 0,50    | 6,10 | 12,90  | 77,50 | 28,40 | 1,68 | 76,30     | 5,46      | 2,78   | 52,75    | 97,00   | 449,00 | 8,10     | ***    | ***     | 44,20   |
| 9059 | 19 | F   | 2,10    | 2,90    | 0,60 | 14,00  | 80,50 | 29,60 | 1,35 | 63,90     | 11,60     | 2,25   | 16,68    | 52,00   | 343,00 | 5,90     | ***    | ***     | 12,30   |
| 9053 | 42 | M   | 1,00    | 1,40    | 1,40 | 12,00  | 78,50 | 28,30 | 3,57 | 152,40    | 7,70      | 4,04   | 203,20   | 46,00   | 244,00 | 2,70     | ***    | ***     | 46,80   |
| 9046 | 26 | F   | 1,40    | 2,00    | 2,50 | 11,70  | 80,40 | 29,00 | 1,96 | 79,00     | 9,36      | 4,27   | 147,40   | 73,00   | 321,00 | 3,10     | ***    | 3,60    | 12,20   |
| 9065 | 22 | M   | 1,20    | 1,80    | 1,80 | 14,10  | 77,00 | 29,00 | 2,24 | 108,90    | 4,80      | 3,58   | 217,00   | 40,00   | 323,00 | 8,50     | 26,10  | 1,10    | 29,80   |
| 9038 | 14 | M   | 1,50    | 2,10    | 2,10 | 12,30  | 75,70 | 27,70 | 1,53 | 67,90     | 5,61      | 3,87   | 84,47    | 63,00   | 345,00 | 3,90     | 136,00 | 3,40    | 26,40   |

**Tabela 6 - Valores encontrados nas análises dos pacientes SS.**

| num  | Id | sex | BI<br>(mg/dL) | BT<br>(mg/dL) | Hb F<br>(%) | HB<br>(g/dL) | MCV<br>(fL) | MCH<br>(pg) | RTC<br>(%) | RTC#<br>(x106/uL) | WBC<br>(x103/uL) | sTfR<br>(mg/L) | FS<br>(ng/mL) | Fe<br>(µg/dL) | TIBC<br>(U/dL) | NP<br>(nmol/L) | IL3<br>(pg/mL) | INFγ<br>(pg/mL) | EPO<br>(mU/mL) |
|------|----|-----|---------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------------|------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| 9039 | 40 | M   | 1,20          | 1,60          | 1,80        | 10,10        | 74,40       | 25,30       | 5,12       | 204,30            | 9,23             | 11,70          | 47,79         | 28,00         | 372,00         | 6,20           | 62,80          | 1,60            | 62,80          |
| 9054 | 45 | M   | 0,70          | 0,90          | 4,00        | 5,90         | 89,80       | 31,70       | 11,24      | 209,10            | 10,10            | 8,59           | 1.647,00      | 54,00         | 239,00         | 7,50           | ****           | 3,80            | 60,10          |
| 9055 | 41 | F   | 4,20          | 5,00          | 4,00        | 8,70         | 87,00       | 30,60       | 9,89       | 280,90            | 8,56             | 9,09           | 68,45         | 88,00         | 335,00         | 4,00           | ***            | 2,50            | 73,50          |
| 9061 | 43 | F   | 2,90          | 3,70          | 7,30        | 9,40         | 88,20       | 31,60       | 12,58      | 373,60            | 10,03            | 12,00          | 98,89         | 79,00         | 267,00         | 6,90           | ***            | 2,70            | 40,30          |
| 9056 | 21 | M   | 2,20          | 3,00          | 5,30        | 7,30         | 92,00       | 32,40       | 18,09      | 407,00            | 12,69            | 9,68           | 1.818,00      | 83,00         | 223,00         | 7,60           | ***            | ***             | 274,00         |
| 9022 | 35 | F   | 1,70          | 2,30          | 6,30        | 5,40         | 91,20       | 34,00       | 10,52      | 167,30            | 12,85            | 7,56           | 511,20        | 110,00        | 162,00         | 7,00           | ***            | 1,60            | 40,10          |
| 9001 | 32 | F   | 2,80          | 3,40          | 4,70        | 7,10         | 87,90       | 29,60       | 7,33       | 175,90            | 6,76             | 9,39           | 27,53         | 36,00         | 188,00         | 8,70           | ***            | ***             | 134,00         |
| 9043 | 17 | F   | 2,80          | 3,40          | 2,00        | 5,60         | 86,80       | 29,60       | 7,22       | 136,50            | 11,55            | 12,30          | 33,88         | 45,00         | 145,00         | 6,40           | ***            | 5,10            | 116,00         |
| 9045 | 31 | F   | 1,00          | 1,50          | 18,50       | 8,50         | 96,10       | 33,10       | 12,26      | 315,10            | 8,55             | 10,80          | 704,50        | 145,00        | 216,00         | 7,50           | ***            | 4,70            | 78,40          |
| 9021 | 33 | F   | 1,30          | 1,70          | 4,20        | 8,00         | 94,30       | 32,50       | 9,40       | 231,20            | 8,24             | 9,30           | 103,30        | 28,00         | 87,00          | 19,00          | 14,40          | 1,60            | 41,90          |
| 9042 | 33 | M   | 9,50          | 13,90         | 7,80        | 6,70         | 96,40       | 34,50       | 25,18      | 488,50            | 14,79            | 10,80          | 172,10        | 58,00         | 192,00         | 33,00          | ***            | 5,30            | 24,70          |
| 9024 | 21 | M   | 3,80          | 4,90          | 3,10        | 6,80         | 82,60       | 28,90       | 15,86      | 372,70            | 8,86             | 10,70          | 71,41         | 80,00         | 90,00          | 9,70           | 27,50          | ***             | 145,00         |
| 9008 | 21 | M   | 0,90          | 1,60          | 2,20        | 8,90         | 76,80       | 24,00       | 6,16       | 228,50            | 6,90             | 7,80           | 255,10        | 27,00         | 224,00         | 6,40           | 33,40          | ***             | 51,80          |
| 9049 | 39 | M   | 0,90          | 1,20          | 0,70        | 10,20        | 67,00       | 22,00       | 4,38       | 203,20            | 7,60             | 10,40          | 47,59         | 25,00         | 390,00         | 2,80           | 103,00         | 5,60            | 70,40          |
| 9033 | 37 | F   | 2,20          | 2,70          | 9,90        | 9,30         | 91,10       | 33,00       | 12,11      | 341,50            | 10,13            | 11,90          | 44,05         | 77,00         | 258,00         | 14,00          | 11,50          | 2,50            | 40,40          |
| 9003 | 22 | F   | 1,70          | 2,30          | 18,50       | 7,50         | 96,90       | 33,60       | 5,32       | 118,60            | 8,64             | 6,47           | 87,37         | 63,00         | 258,00         | 7,00           | 137,50         | 2,50            | 95,60          |
| 9004 | 20 | F   | 4,00          | 4,80          | 10,00       | 8,00         | 24,20       | 28,90       | 7,33       | 203,00            | 10,37            | 8,37           | 216,20        | 45,00         | 280,00         | 5,80           | ***            | 1,60            | 59,50          |
| 9002 | 33 | F   | 1,20          | 3,90          | 2,50        | 5,70         | 85,10       | 29,40       | 8,93       | 173,20            | 7,69             | 12,10          | 27,87         | 48,00         | 165,00         | 8,40           | ***            | ***             | 70,20          |
| 9017 | 36 | F   | 3,30          | 4,30          | 5,90        | 7,00         | 87,30       | 31,70       | 12,97      | 286,60            | 11,29            | 10,20          | 67,35         | 62,00         | 266,00         | 8,80           | 20,20          | ***             | 89,40          |
| 9028 | 42 | F   | 2,20          | 2,90          | 1,10        | 7,60         | 89,60       | 31,50       | 10,33      | 249,00            | 8,41             | 9,84           | 37,83         | 48,00         | 337,00         | 6,70           | 46,60          | 22,00           | 102,00         |
| 9016 | 23 | F   | 5,50          | 6,00          | 10,50       | 8,50         | 85,90       | 29,90       | 4,63       | 131,50            | 9,39             | 5,87           | 310,20        | 68,00         | 219,00         | 5,20           | 40,70          | ***             | 32,00          |
| 9041 | 38 | F   | 2,50          | 3,20          | 7,20        | 6,50         | 92,10       | 32,00       | 16,79      | 340,80            | 14,28            | 13,10          | 429,90        | 43,00         | 198,00         | 7,70           | 31,90          | ***             | 126,00         |
| 9007 | 40 | F   | 4,70          | 5,30          | 6,00        | 7,10         | 87,00       | 31,80       | 11,17      | 249,10            | 11,30            | 9,58           | 33,30         | 59,00         | 273,00         | 4,00           | ***            | ***             | 85,00          |
| 9052 | 32 | M   | 8,40          | 8,90          | 4,40        | 6,50         | 88,00       | 32,50       | 11,12      | 222,40            | 13,98            | 15,60          | 259,80        | 129,00        | 236,00         | 4,50           | 45,10          | 3,10            | 58,60          |
| 9032 | 40 | F   | 0,80          | 1,20          | 8,60        | 6,90         | 98,10       | 31,90       | 16,43      | 354,90            | 13,58            | 7,21           | 440,20        | 79,00         | 301,00         | 6,70           | ***            | ***             | 179,00         |
| 9011 | 29 | F   | 3,30          | 4,20          | 11,70       | 6,50         | 93,30       | 33,70       | 17,05      | 329,10            | 10,21            | 12,00          | 172,10        | 54,00         | 178,00         | 4,30           | 85,10          | ***             | 48,60          |
| 9035 | 35 | M   | 4,50          | 5,00          | 5,70        | 8,20         | 82,20       | 29,20       | 8,21       | 230,70            | 7,67             | 6,93           | 93,33         | 73,00         | 229,00         | 5,50           | ***            | 2,20            | 71,90          |
| 9036 | 49 | F   | 3,50          | 4,80          | 19,60       | 9,60         | 86,90       | 29,90       | 8,79       | 282,20            | 10,14            | 14,20          | 2.385,00      | 41,00         | 288,00         | 14,00          | ***            | 16,70           | 37,00          |
| 9037 | 26 | F   | 3,10          | 4,80          | 10,60       | 9,40         | 89,30       | 32,30       | 20,83      | 606,20            | 15,19            | 12,30          | 118,70        | 111,00        | 241,00         | 7,50           | 51,00          | 1,60            | 44,80          |
| 9040 | 35 | F   | 1,00          | 1,40          | 19,60       | 8,90         | 80,10       | 27,70       | 6,44       | 206,70            | 8,72             | 8,65           | 78,47         | 42,00         | 236,00         | 3,10           | 74,70          | ***             | 16,20          |
| 9044 | 44 | F   | 1,00          | 1,50          | 11,40       | 8,60         | 95,10       | 32,30       | 9,28       | 246,80            | 7,82             | 5,76           | 2.286,00      | 79,00         | 235,00         | 9,50           | ***            | ***             | 40,60          |
| 9050 | 27 | F   | 0,90          | 1,30          | 19,30       | 8,70         | 112,70      | 40,80       | 8,29       | 176,60            | 7,57             | 4,80           | 575,50        | 46,00         | 208,00         | 3,20           | 119,40         | ***             | 71,90          |
| 9062 | 28 | M   | 3,00          | 4,00          | 5,90        | 8,20         | 95,40       | 34,60       | 13,68      | 324,20            | 9,29             | 11,50          | 1.952,00      | 40,00         | 147,00         | 8,50           | 18,80          | 2,00            | 145,00         |
| 9063 | 29 | F   | 1,40          | 2,00          | 22,00       | 11,40        | 108,70      | 39,60       | 5,03       | 144,90            | 8,37             | 3,19           | 369,00        | 62,00         | 297,00         | 4,60           | 296,00         | ***             | 34,40          |
| 9064 | 54 | F   | 2,20          | 2,90          | 19,50       | 14,10        | 77,00       | 29,00       | 2,24       | 334,80            | 10,50            | 19,50          | 102,00        | 89,00         | 255,00         | 8,00           | 110,40         | ***             | 64,10          |