

MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI BEZERRA

**Determinação das Propriedades Adesivas e
Funcionais em Glóbulos Vermelhos,
Neutrófilos e Plaquetas de Pacientes com
Hemoglobinopatia SC, S/ β Talassemia e
Talassemia Intermediária**

Campinas

2009

Determinação das Propriedades Adesivas e Funcionais em Glóbulos Vermelhos, Neutrófilos e Plaquetas de Pacientes com Hemoglobinopatia SC, S/β Talassemia e Talassemia Intermediária

Aluno: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Orientador: Prof Dr. Fernando Ferreira Costa

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental.

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B469d Bezerra, Marcos André Cavalcanti
Determinação das propriedades adesivas e funcionais em glóbulos vermelhos, neutrófilos e plaquetas de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/β Talassemia e Talassemia intermediária / Marcos André Cavalcanti Bezerra. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença falciforme. 2. Anemia falciforme. 3. Talassemia Beta. 3. Quimiotaxia. I. Costa, Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Adhesive and functional properties of red blood cells, neutrophils and platelets in patients with hemoglobinopathy SC, HbS-β Talassemia and Talassemia intermedia

Keywords: • Sickle cell disease
• Anemia, Sickle cell
• β Talassemia
• Chemotaxis

Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica
Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Prof. Dr. Antônio Fabron Junior
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Data da defesa: 22-05-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

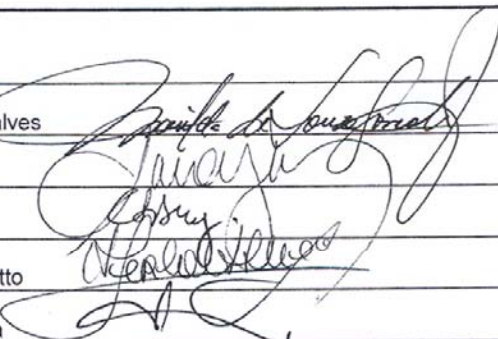
Marcos Andre Cavalcanti Bezerra



Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Membros:

1. Prof. Dr. Marilda de Souza Gonçalves
2. Prof. Dr. Antonio Fabron Junior
3. Prof. Dr. Carmen Silvia Bertuzzo
4. Prof. Dr. Helena Zerlotti Wolf Grotto
5. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/05/2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudio e Edna, por nunca medirem esforços para me ajudar, incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida. Pelo grande amor e por serem essenciais na minha vida.

Aos meus irmãos, Júnior e Gleidson, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À minha esposa, Mariana, pelo estímulo, paciência e muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Fernando Costa**, pela orientação, compreensão, amizade, profissionalismo e por todos os ensinamentos transmitidos durante os anos de convívio.

Ao **Dr. Aderson Araújo**, meu co-orientador, pelo incentivo, amizade, compreensão, confiança e apoio demonstrados durante os anos de convivência.

A **Carla Fernanda**, pela disponibilidade em compartilhar conhecimentos e inestimável ajuda nas várias etapas deste trabalho. Pela amizade, paciência e carinho.

A **Dulcinéia e Magnun**, pela ajuda, incentivo e disponibilidade em ensinar. Pelas dicas, paciência e amizade. Pelos bons momentos vividos nesses anos de convívio.

A **Carol e Sheley**, pela colaboração e ajuda. Pelos momentos de companherismo, carinho e amizade no decorrer desses anos.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobina e Genoma, **Anderson, Denise, Daniela, Flávia Costa, Renata, Ucha, Kleber e Nicola**, pela amizade, carinho, e auxílios técnicos e científicos na realização deste trabalho.

A **Betânia**, por sua participação direta neste trabalho, sempre prestativa. Pela disponibilidade na coleta e convocação dos pacientes desse estudo. Pela amizade e apoio em todas as horas.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobina e Genoma, **Emília, Ana Flávia, Diana, Fernanda, Flávia, Camila, Venina, Lena, Simone, Dilmara, Lediane e Andréia** pelo bom relacionamento, carinho e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas, **Dra Fátima Sonati, Elza, Denise, Felipe, Susan e Cintia** pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias do Hemope, **Marília, Karine, Cayo Bruno, Rafael e Ivane**, por serem sempre prestativos e dispostos a colaborar.

Aos médicos hematologistas da Fundação Hemope, **Dra. Ana Cláudia, Dra. Frieda, Dra. Jaqueline, Dra. Flavia, Dra. Creusa, Dra. Fátima Araújo, Dra. Graça Carvalho,**

Dra. Fábria, Dra. Ana Fausta, pelo acompanhamento dos pacientes e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao **CNPq**, pelo suporte financeiro.

A minha esposa, **Mariana**, pelo amor, carinho, principalmente compreensão e paciência. Pela ajuda e participação neste trabalho e por sempre está presente em todos os momentos e em qualquer situação.

Aos meus amigos de Recife, **Roberto, Germano, Otoni, Jefferson, Kaliny, Liciane, Jemima**, que mesmo à distância me apoiaram e me incentivaram.

Aos meus amigos, **Emanuel e Magnun**, pelo companherismo e amizade. Pelos conselhos e por sempre estarem presentes em todos os momentos.

A meu amigo **Marin**, pela amizade e estímulo. Pelos bons momentos compartilhados nesses últimos anos.

A meus pais **Cláudio e Edna** pelo amor e dedicação incondicionais, e aos meus irmãos **Júnior e Gleidson**, por sempre me apoiarem e fazer parte dessa família que eu adoro.

A minha sogra **Betinha**, meu sogro **Arquimedes** e aos meus cunhados **Jaime, Luciana e Paula**, pelo carinho e incentivo nessa etapa da minha vida.

A **todos os meus familiares**, por todo carinho, amor e incentivo a mim dispensados.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS	ix
SUMÁRIO.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxix
RESUMO	xxx
ABSTRACT	xxxv
INTRODUÇÃO.....	39
1.1- Hemoglobinopatias	41
1.1.1- Doenças Falciformes.....	41
1.1.2- Fisiopatologia e Aspectos Clínicos das DF.....	44
1.1.3- Vaso-oclusão	45
1.1.4- Moléculas de Adesão	47
1.1.5- Quimiotaxia.....	49
1.1.6- Citocinas.....	50
1.1.7- <i>Stress</i> Oxidativo	51
1.2- Talassemias β	52
1.2.1- Formas Clínicas da Talassemia Beta.....	52
1.2.2- Talassemia β Intermediária	53
1.2.3- Fisiopatologia da talassemia β intermediária	55
1.3- Justificativa	56
OBJETIVOS.....	59
PACIENTES E MÉTODOS.....	63
3.1- Pacientes e Controles	65
3.2- Aspectos Éticos da Pesquisa	66
3.3- Separação de Plasma	67
3.4- Dosagem Plasmática de Citocinas Inflamatórias	67
3.5- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)	67

3.6- Isolamento de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico	67
3.7- Separação de Células Vermelhas	68
3.8- Separação de Plaquetas	68
3.9- Ensaio de Adesão Estático de Neutrófilos	68
3.10- Quimiotaxia <i>in vitro</i> de Neutrófilos	69
3.11- Ensaio de Adesão Estático de Células Vermelhas	70
3.12- Ensaio de Adesão Estático de Plaquetas	71
3.13- Citometria de Fluxo.....	72
3.14- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão de Células Vermelhas	72
3.15- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão de Neutrófilos.....	73
3.16- Determinação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	73
3.17- Análise Estatística	74
RESULTADOS	75
4.1- Adesão Estática <i>in vitro</i> de Neutrófilos de Pacientes com DF e Indivíduos Controle	77
4.2- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão dos Neutrófilos de Pacientes com DF e Indivíduos Controle	78
4.3- Capacidade Quimiotática <i>in vitro</i> de Neutrófilos de Pacientes com DF e Indivíduos Controle	79
4.5- Expressão Protéica de CD49d, CD36 e CD71 em Células Vermelhas de Pacientes com DF e Indivíduos Controle	81
4.6- Adesão Estático de Plaquetas de Pacientes com DF e Indivíduos Controle	82
4.7- Níveis das Citocinas Inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em Amostras de Plasma de Pacientes com DF e Indivíduos Controle	83
4.8- Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na DF e Indivíduos Controle	85
4.9- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) na DF e Indivíduos Controle	88
4.10- Adesão Estática <i>in vitro</i> de Neutrófilos, Células Vermelhas e Plaquetas de Pacientes com TI e Indivíduos Controle.....	89

4.11- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão nos Neutrófilos de Pacientes com TI e Indivíduos Controle.....	91
CD11b (%)......	91
4.12- Capacidade Quimiotática <i>in vitro</i> de Neutrófilos de Pacientes com TI e Indivíduos Controle	92
4.13- Expressão Protéica de CD49d, CD36 e CD71 em Células Vermelhas de Pacientes com TI e Indivíduos Controle.....	93
4.14- Níveis das Citocinas Inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em Amostras de Pacientes com TI e Indivíduos Controle	94
4.15- Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na TI e em Indivíduos Controle	95
4.16- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) na TI e em Indivíduos Controle	96
DISCUSSÃO	97
CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXO	129

LISTA DE ABREVIATURAS

α - Alfa

AA – Indivíduos controle normais

AF – Anemia falciforme

AVC - Acidente vascular cerebral

β - Beta

β^A - Alelo beta normal

β^S - Alelo beta S

β^+ - Beta mais

β^0 - Beta zero

β tal - Talassemia beta

BSA – Soro albumina bovina

dL – Decilitros

DF – Doença Falciforme

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EPM – Erro padrão médio

FB - Fibrinogênio

FN – Fibronectina

Hb – Hemoglobina

HbA - Hemoglobina A

HbA₂ - Hemoglobina A₂

HbC – Hemoglobina C

HbS – Hemoglobina S

HbF - Hemoglobina Fetal

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

HTAB - Hexadeciltrimetil amônio bromida

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1

IL - Interleucina

IVS – Íntron

LFA-1 – Antígeno-1 de função linfocitária

μL – Microlitros
mL – Mililitros
Mac-1 – Antígeno-1 de macrófago
MFI – Intensidade média de fluorescência
MPO – Enzima mieloperoxidase
PAF – Fator ativador de plaquetas
PBS – Salina tamponada fosfatada
pg - Picogramas
RNA - Ácido ribonucléico
RNA_m - RNA mensageiro
rpm - Rotações por minuto
ROS – Espécies reativas de oxigênio
S/βtal - Interação anemia falciforme / talassemia beta
SOD – Superóxido Dismutase
TI – Talassemia Intermediária
TNF – Fator de necrose tumoral
VCAM-1 – Molécula de adesão vascular -1
VCM - Volume corpuscular médio
VLA-4 – Antígeno de ativação tardio tipo 4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo fisiopatológico da DF (Steinberg, 2006).	44
Figura 2: Adesão basal de neutrófilos isolados de indivíduos controle e pacientes SS (n=12), SC (n=20), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=17), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=15) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) (n=9) à FN. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de células aderidas +/- erro médio padrão (EPM). Os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 comparado com o grupo AA (n=20); #P<0,05 comparado com o grupo SS.	77
Figura 3: Quimiotaxia <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos controle (AA) e de pacientes SS (n=15), SC (n=15), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=12), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=12) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) (n=8). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. *P<0,05 comparado com o grupo AA (n=15); #P<0,05 comparado com o grupo SS.	79
Figura 4: Adesão basal de células vermelhas de indivíduos controle (AA) e células vermelhas de pacientes SS (n=10), SC (n=15), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=14), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=15) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) (n=8) à FN. Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 comparado com o grupo AA (n=18); #P<0,05 comparado com o grupo SS.	80
Figura 5: Adesão basal das plaquetas de indivíduos controle (AA) (n=20) e de pacientes SS (10), SC (12), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=14), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=14) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) (n=8) ao FB (50 μ g/ml). Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS.	82
Figura 6: A, B, C e D: Níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em amostras de pacientes com DF: SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) e indivíduos controle	

(AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS.	84
Figura 7: Produção de ROS nos neutrófilos de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS. Grupos: SS (n=12), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=15).	85
Figura 8: Produção de ROS nas células vermelhas de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS. SS (n=12), SC (n=10), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=15)	86
Figura 9: Produção de ROS nas células mononucleares de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS. Grupos: SS (n=12), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=15).	87
Figura 10: Atividade enzimática de SOD no plasma de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA. SS (n=15), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=10), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=10) e Controle AA (n=15).	88
Figura 11: A, B e C: Adesão basal dos neutrófilos (FN), células vermelhas (FN) e plaquetas (FB) isolados de indivíduos controle (AA) (n≤16) e pacientes TI (n≤16). Valores representados por média ± EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 comparado com o grupo AA.....	90
Figura 12: Quimiotaxia <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos controle (AA) (n=16) e de pacientes com TI (n=16), para avaliação da migração espontânea. Os resultados estão expressos como média ± EPM. *P<0,05 comparado com o grupo AA.....	92
Figura 13: A, B, C e D: Concentração das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α em amostras de pacientes TI homozigotos para mutação IVS-I-6 (T→C) e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA.....	94

Figura 14: A, B e C: Produção de ROS nos neutrófilos, células vermelhas e plaquetas de pacientes com TI (n≤13) e indivíduos controle (AA) (n≤15). *P<0,05 comparado com o grupo AA.....	95
Figura 15: Atividade enzimática de SOD no plasma de pacientes com TI (n=15) e indivíduos controle (AA) (n=15). *P<0,05 comparado com o grupo AA.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados hematológicos dos pacientes com DF e talassêmicos intermediários que participaram do estudo. Os valores estão expressos como média (valor mínimo – valor máximo).....	66
Tabela 2: Expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos neutrófilos de indivíduos controle (AA) e pacientes com DF, determinados por citometria de fluxo. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média do percentual de células positivas.	78
Tabela 3: Porcentagem da população de células positivas (%) para as moléculas estudadas, em células vermelhas de indivíduos controles e de pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T). Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.	81
Tabela 4: Expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos neutrófilos de indivíduos controle (AA) (n=15) e pacientes com TI (n=15), determinados por citometria de fluxo. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média do percentual de células positivas.....	91
Tabela 5: Expressão de subunidades de moléculas de adesão na superfície de células vermelhas: CD36, CD49d e CD71 de indivíduos controle (n=15) e pacientes com TI (n=15). Os resultados representam o percentual de células positivas. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.	93

RESUMO

O estado inflamatório crônico que ocorre na doença falciforme (DF) é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente. Estudos prévios sobre as propriedades adesivas e funcionais das células são restritos à forma homozigota do gene da HbS (SS). No entanto, trabalhos que avaliem essas características celulares, que possam contribuir para o esclarecimento da heterogeneidade clínica em outros grupos de DF e talassemia intermediária (TI), são escassos na literatura. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade adesiva de células vermelhas, neutrófilos e plaquetas, quimiotaxia dos neutrófilos, os níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias e o *stress* oxidativo na DF e β -TI. Dessa maneira foram selecionados pacientes com DF: SS ($n \leq 20$), SC ($n \leq 20$), 3 grupos com S/ β talassemia - S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) ($n \leq 17$), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) ($n \leq 16$), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) ($n \leq 12$) - e TI homozigotos para a mutação IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) ($n \leq 20$), acompanhados na Fundação HEMOPE. As técnicas utilizadas no desenvolvimento desse estudo foram: ensaio de quimiotaxia (ChemoTx) para avaliação da capacidade migratória dos neutrófilos, adesão estática para determinação da adesão basal das células, citometria de fluxo para avaliar a produção de ROS e a expressão de moléculas de adesão, e ELISA para determinar a atividade da superóxido dismutase (SOD) e a dosagem das citocinas. Para avaliação de nossos resultados, todos os grupos de pacientes foram comparados ao grupo controle AA: a adesão de neutrófilos e plaquetas mostrou-se significativamente aumentada em todos os grupos de DF; somente os grupos SS e SC apresentaram capacidade quimiotática significativamente aumentada, assim como a adesão de células vermelhas e a expressão das moléculas de adesão CD36 e CD49d. Os níveis plasmáticos das citocinas IL1- β , IL-6, IL-8 e TNF- α mostraram-se significativamente aumentados no grupo SS, e nos demais grupos de DF apresentaram uma distribuição heterogênea. Observamos um aumento significativo na produção de ROS em células vermelhas, mononucleares e neutrófilos de todos os grupos de DF, exceto para os grupos S/ β nas células vermelhas. Além disso, a atividade plasmática da SOD mostrou-se reduzida nos grupos SS, SC e S/ β -Cd39. A adesão dos neutrófilos, células vermelhas e plaquetas foi significativamente maior nos pacientes com TI, assim como a expressão das moléculas CD36 e CD49d nas células vermelhas e a capacidade quimiotática dos neutrófilos. Nesses

pacientes, a produção de ROS e os níveis plasmáticos das citocinas foram significativamente aumentados, enquanto que a atividade enzimática da SOD foi significativamente reduzida. Apesar da doença SC possuir uma clínica mais branda, nossos dados sugerem que neutrófilos, glóbulos vermelhos e plaquetas desses pacientes possuem características adesivas e quimiotáticas semelhantes às encontradas nas células de pacientes com AF. Além disso, nossos resultados sugerem que quanto maiores os níveis de HbA na S/ β talassemia, menor a adesão de neutrófilos, células vermelhas e plaquetas, podendo explicar as diferenças clínicas encontradas nesses pacientes em função do genótipo. É possível que o aumento da aderência, da capacidade quimiotática, da produção de ROS, das citocinas e diminuição do mecanismo antioxidante, observados neste estudo, contribuam nas complicações clínicas encontradas na β -TI, tais como hipertensão pulmonar e úlceras de perna. Estudos adicionais podem contribuir para o entendimento das diferenças na apresentação clínica desses pacientes.

ABSTRACT

The chronic inflammatory state that occurs in sickle cell disease (SCD) is due to several factors that are interlinked and feeds back to a permanent inflammatory cycle. Previous studies about the adhesive properties and functional cells are restricted to the homozygous form of the HbS gene (SS). However, studies that assess the cellular characteristics that may contribute to the clarification of clinical heterogeneity in other groups of SCD and thalassemia intermedia (TI), are scarce in the literature. The aim of this study was to evaluate the adhesive properties of red blood cells (RBC), platelets and neutrophils (NS), NS chemotaxis, inflammatory cytokine plasma levels and oxidative stress in SCD and β -TI patients. Thus, we selected patients with different SCD genotypes: SS ($n \leq 20$), SC ($n \leq 20$), three groups of HbS/ β thalassemia - HbS/ $\beta 39$ (C $\rightarrow$ T) ($n \leq 12$), HbS/IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) ($n \leq 16$), and HbS/IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) ($n \leq 17$) - and patients with homozygous thalassemia intermedia IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) - followed regularly at the Fundação HEMOPE – Brazil. The techniques used in the development of this study were: chemotaxis assay (ChemoTx) to evaluate the migratory ability of neutrophils, basal adhesion was compared using static adhesion assays, flow cytometry to assess the production of ROS and expression of adhesion molecules, and ELISA to determine the superoxide dismutase (SOD) activity and cytokine plasma levels. For evaluation of our results, all groups of patients were compared with the AA control group: the neutrophil and platelet adhesions were significantly increased in all groups of SCD, only the SS and SC groups showed significant increase in the chemotactic ability, as well as the RBC adhesion and the expression of adhesion molecules CD36 and CD49d. All the SCD groups investigated showed an increase in IL-6 plasma levels. IL-1 β levels were significantly higher in the S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Cd39 and SS groups. Plasma levels of IL-8 were increased only in the SS and SC groups, however TNF- α levels were significantly higher in SS and the three groups with HbS- β thalassemia. NS and mononuclear cell ROS production was significantly increased in all SCD groups, however red blood ROS production was higher only in the SS and SC groups. Moreover, the SOD plasma activity was shown to be reduced in groups SS, SC and S/ β -Cd39. The NS, RBC and platelets adhesion was significantly higher in TI patients, as well as the expression of molecules CD36 and CD49d in RBC and

chemotactic ability of NS. In these patients, the ROS production and cytokines plasma levels were significantly increased, while SOD plasma activity was significantly reduced.

Although SC disease has a milder clinical manifestations, our data suggest that NS, RBC and platelets of these patients have chemotactic and adhesive characteristics similar to those found in cells of patients with SS. Moreover, our results suggest that the higher levels of HbA in S/ β thalassemia reduce the NS, RBC and platelets adhesion and may explain the clinical differences found in these patients, according to genotype. It is possible that the increase in the cell adherence, chemotactic capacity, ROS production, of cytokines levels and the reduction in antioxidant mechanism, observed in this study, contribute to several clinical complications of β -TI, such as pulmonary hypertension and leg ulcers. Further studies may contribute to our understanding of the differences in the clinical presentation of these patients.

Introdução

1.1- Hemoglobinopatias

As doenças da hemoglobina (Hb) são chamadas de hemoglobinopatias. Dois defeitos principais podem ocorrer: os estruturais e os de ritmo de síntese (talassemias). Dentre os defeitos estruturais mais importantes está a HbS ($\alpha_2\beta_2^{6\text{GLU}\rightarrow\text{VAL}}$), conhecida pela gravidade e frequência, particularmente entre os povos africanos ou afro-descendentes e HbC ($\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}}$), ambas variantes de cadeias β (Bunn e Forget, 1986).

As talassemias são ocasionadas pela redução ou ausência de síntese das cadeias globínicas, levando ao acúmulo daquela cadeia cuja produção está preservada. As cadeias acumuladas precipitam e acabam por lesar a membrana das hemácias, levando à destruição prematura dos eritrócitos. As talassemias mais conhecidas são as α e β , pela frequência e manifestações clínicas de considerável importância nos portadores, já que as cadeias α e β formam a hemoglobina A (Bunn e Forget, 1986; Higgs, 1993).

1.1.1- Doenças Falciformes

A doença falciforme é uma hemoglobinopatia comum que afeta 1/1.400 nascidos vivos no Estado de Pernambuco (Ministério da Saúde, 2006; www.saude.gov.br). A anemia falciforme (AF) é uma condição herdada causada por uma mutação de ponto no gene da globina β (*HBB*), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição do gene da cadeia β globínica (*HBB*; $\beta^6\text{GAG}\rightarrow\text{GTG}$; $\text{glu}^6 \rightarrow \text{val}^6$). Essa mutação resulta em uma hemoglobina anormal (HbS). Quando desoxigenada, HbS polimeriza, formando estruturas filamentosas (polímeros de HbS desoxigenada) que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falciformes. As células rígidas, conhecidas como células em forma de foice, são responsáveis pela oclusão vascular, episódios de dor e lesão de órgãos alvos, que representam os fenômenos principais dessa doença (Nagel e Platt, 2001; Steinberg, 2006).

“Doenças Falciformes” (DF) é um termo genérico usado para identificar condições em que a associação da HbS com outra alteração de Hb, estrutural ou talassêmica, leva a um quadro clínico similar ao da anemia falciforme (AF) (homozigose do gene da HbS – SS). As doenças falciformes compreendem vários diferentes genótipos, entre os principais podemos citar: a anemia falciforme (SS), doença da HbSC (heterozigoto composto para os genes da HbS e HbC) e a S- β talassemia (heterozigose composta para o gene da HbS e

talassemia β) (Steinberg, 2005). Os heterozigotos da HbS (AS) são, via de regra, assintomáticos (Serjeant, 1997; Steinberg e Adewoye, 2006).

As DF (SS, SC e S/ β tal) tem ampla distribuição mundial e são um problema de saúde pública no Brasil, com prevalência de 0,1 a 0,3% da população negra, com tendência a acometer parcela cada vez mais significativa da população devido ao alto grau de miscigenação em nosso país (Ramalho et al., 1996). As regiões onde a condição, tanto de portador quanto de doente é mais prevalente, são o sudeste e o nordeste. Bandeira et al. (1999) encontraram a frequência de 5,3% para os heterozigotos AS e de 0,2% para doença falciforme numa população de recém-nascidos atendidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Com a implantação do teste de triagem neonatal para hemoglobinopatias, foi possível calcular a proporção de nascidos vivos com o traço falciforme no estado de Pernambuco que é de 1:21, enquanto a proporção de diagnosticados com DF é de 1:1400 (Ministério da Saúde, 2006).

As DF representam as mais frequentes alterações hereditárias das hemoglobinas no Brasil. A HbC não participa de maneira efetiva do polímero de desoxi-HbS e por esse motivo os pacientes com hemoglobinopatia SC têm evolução clínica mais benigna que paciente SS (Costa, 2004).

Sua relevância clínica maior é quando se apresenta em combinação com a HbS, dando origem a uma forma de doença falciforme. Os portadores da doença falciforme HbSC apresentam complicações clínicas menos graves que os homozigotos S, tendo menos crises dolorosas, infecções e priapismo, apesar de apresentarem ocorrência maior de tromboembolismo e lesões oftalmológicas (Steinberg et al., 1996).

Uma outra possibilidade de ocorrência de genes talassêmicos é na DF em que o gene da Hb S está associado ao da talassemia β , produzindo o que se chama de S/ β talassemia. A interação S/ β -talassemia é uma das variantes mais frequentes, ocorrendo em 1 a cada 8.000 mil nascimentos em Pernambuco. Possíveis combinações do gene da HbS com genes talassêmicos podem resultar em S/ β^+ ou S/ β^0 talassemia. Tais composições moleculares costumam resultar em formas clínicas menos graves de DF (Zago, 2004). Essa condição, clínica e geneticamente heterogênea, resulta em quantidades variáveis de HbS, HbF e HbA, dependendo da mutação talassêmica associada (Weatherall e Clegg, 2001). Do ponto de vista clínico, os pacientes com S/ β^0 talassemia têm evolução mais grave,

semelhante aos homozigotos SS. Os pacientes S/ β^+ talassemia podem apresentar evolução clínica grave ou moderada, dependendo da mutação de β - talassemia envolvida (Zago, 2004).

Uma das características marcantes das DF é a variabilidade de suas manifestações clínicas, e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas (Lettre et al., 2008), variando de formas quase assintomáticas até clinicamente graves, responsáveis por alta mortalidade na infância (Serjeant, 1997; Higgs e Wood, 2008).

Vários fatores genéticos têm grande importância na modulação do quadro clínico das DF. Entre os mais conhecidos estão as variações nos níveis da Hb Fetal (HbF), o tipo de haplótipo ligado ao *cluster* da globina β e a presença de talassemia α (Higgs e Wood 2008, Lettre et al., 2008). Os níveis de HbF são inversamente proporcionais à gravidade da doença (Steinberg e Adewoye, 2006).

Há cinco diferentes haplótipos relacionados ao gene da HbS: Senegal, Benin, Bantu, Camarões e Árabe-indiano. Os haplótipos também estão relacionados a quadros clínicos e níveis de HbF variáveis: o Senegal está associado a níveis elevados de HbF (>15%) e curso clínico mais brando, o Benin a níveis medianos de HbF (5 a 15%) e curso clínico intermediário, o Bantu a níveis diminuídos de HbF (<5%) e quadro clínico mais grave, e os portadores do haplótipo Saudi apresentam níveis elevados de HbF com curso clínico heterogêneo (Powars, 1991).

A concomitância da DF com a talassemia α tem como consequência a redução do volume corpuscular médio (VCM), menor número de reticulócitos e menor grau de hemólise, conferindo assim uma melhora clínica para os pacientes. Os benefícios na evolução clínica que essas alterações podem produzir, principalmente a redução na concentração da hemoglobina intracelular, ainda não estão completamente estabelecidos. Aparentemente, úlceras de perna, AVC e anormalidades na retina são menos frequentes em pacientes com talassemia alfa, embora alguns estudos apontem que estes pacientes poderiam apresentar mais episódios dolorosos devido ao aumento da viscosidade sanguínea correspondente ao aumento da hemoglobina (Costa, 2004; Steinberg e Adewoye, 2006).

1.1.2- Fisiopatologia e Aspectos Clínicos das DF

A fisiopatologia das DF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada que, por sua vez, leva à hemólise crônica e a vaso-oclusão (Steinberg, 2006) (Figura 1). Sob condições de baixas tensões de oxigênio, a HbS pode polimerizar formando estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falcizadas. O fenômeno de falcização pode ser revertido quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos, no entanto, falcizações sucessivas alteram permanentemente a estrutura da membrana da hemácia, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas (Steinberg, 2008).

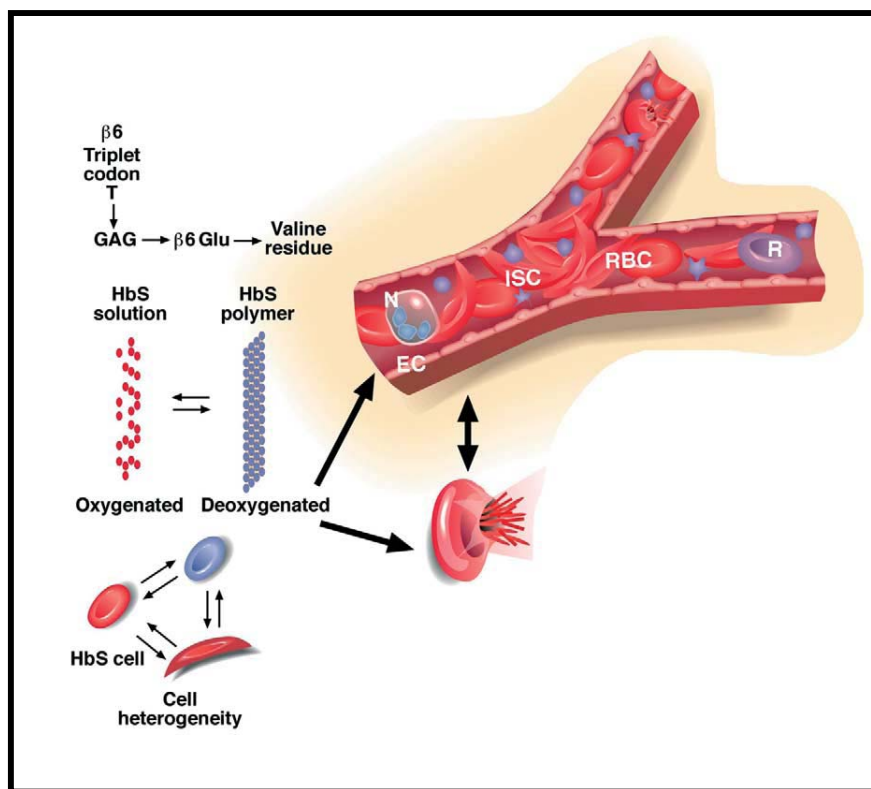


Figura 1: Mecanismo fisiopatológico da DF (Steinberg, 2006).

A polimerização de desoxi-HbS depende de numerosas variáveis, como concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS, temperatura, pressão, força iônica, e presença de hemoglobinas normais e anormais (Costa, 2004; Stuart e Nagel, 2004).

A polimerização da HbS é o evento molecular primário na patogênese da DF, resultando em uma série de alterações na morfologia e função da hemácia, e estas alterações resultam em acentuada redução de sua deformabilidade, a qual leva ao encurtamento do tempo de vida da célula. (Steinberg, 1999; Steinberg e Rodgers, 2001). A forma anormal do eritrócito falciforme, aliada à sua acentuada rigidez, viscosidade aumentada e tendência a aderir às células do endotélio, favorece a ocorrência de três mecanismos patológicos principais: hemólise, vaso-oclusão e acúmulo destas células anormais em alguns órgãos, aumentando-os de tamanho. A anemia, icterícia, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações ósseas podem ser atribuídas à hemólise. Os eventos vaso-oclusivos podem gerar, de acordo com o local envolvido, dor abdominal, necrose asséptica da cabeça do fêmur, priapismo, artralgia, dactilite, hipostenúria, hematúria, acidente vascular cerebral (AVC), úlcera de perna e lesões na retina. Além disso, o fenômeno da vaso-oclusão pode levar à destruição progressiva do baço e conseqüentemente à auto-esplenectomia, sendo responsável pela susceptibilidade aumentada a infecções graves, que estão entre as principais causas de morte em todas as idades nesse grupo de pacientes (Serjeant, 1997; Stuart e Nagel, 2004).

1.1.3- Vaso-oclusão

O processo pelo qual a perfusão normal dos tecidos é interrompida por hemácias falciformes é complexo e não completamente compreendido. Esse processo é chamado de vasooclusão (Steinberg, 2008). A fisiopatologia da AF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada que por sua vez, leva à hemólise crônica e à vaso-oclusão (Steinberg, 2006). Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem, principalmente, em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento, a tensão do oxigênio é baixa, ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. Os mecanismos fisiopatológicos da vaso-oclusão permanecem controversos, embora alguns pesquisadores concordem que o aumento da ligação entre os eritrócitos falcizados ao endotélio vascular seja um importante fator neste fenômeno complexo (Hebbel, 1997). Acredita-se que o processo de vaso-oclusão compreende múltiplos passos, e é o resultado de um complexo cenário envolvendo interações de diferentes tipos celulares, incluindo células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, leucócitos ativados, células

endoteliais anormalmente ativadas (Solovey et al., 1997), plaquetas e proteínas plasmáticas (Chiang e Frenette, 2005; De Franceschi e Corrocher, 2004; Kasschau et al., 1996). Vaso-oclusões recorrentes, processos de isquemia-reperusão e consequente ativação do endotélio vascular e injúria, induzem a contínuas respostas inflamatórias na DF, que se propagam por níveis elevados de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e *stress* oxidativo (Conran et al., 2009).

As DF caracterizam-se por manifestações inflamatórias crônicas (Zago e Pinto, 2007). Muitas evidências comprovam que leucócitos influenciam na manifestação clínica da AF e a leucocitose é diretamente associada com progressão da gravidade da doença (Miller et al., 2000; Frenette, 2002). Os leucócitos contribuem na AF por aderirem a parede dos vasos sanguíneos e obstruírem o lúmen, promovendo agregação de outras células sanguíneas com mais efetivo bloqueio do lúmen, estimulando o endotélio por aumentar a expressão de ligantes para moléculas de adesão nas células sanguíneas, e causando dano tecidual e reação inflamatória, os quais predis põem a vaso-oclusão. Neutrófilos de pacientes com DF apresentam adesão aumentada a fibronectina e endotelina (Kasschau et al., 1996; Fadlon et al., 1998; Okpala, 2004; Canalli et al., 2007). A contagem de neutrófilos tem uma relação direta com a severidade da doença e a leucocitose tem sido correlacionada com o aumento do índice de morte prematura em criança com AF, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e nefropatia (Platt et al., 1994; Miller et al., 2000; Okpala et al., 2002). Adicionalmente, Canalli e cols (2004) demonstraram que os eosinófilos de pacientes com AF são numericamente maiores e apresentam propriedades adesivas aumentadas. O aumento dos números e ativação dos leucócitos são importantes mediadores da inflamação na anemia falciforme (Belcher et al., 2000; Lard et al., 1999). Os leucócitos podem aderir a outras células como, eritrócitos falcizados ou não, plaquetas e à parede do vaso sanguíneo, podendo ter um papel central no desenvolvimento da vaso-oclusão (Okpala, 2006). Proteínas plasmáticas como a fibronectina, o fibrinogênio, fator de Von Willebrand e trombospondina, presentes em níveis elevados no plasma de pacientes com AF também estão relacionados à indução da adesão das células falcizadas ao endotélio vascular (Kasschau et al., 1996).

Muitas evidências sugerem que as plaquetas circulam em um estado ativado em indivíduos com DF. As plaquetas na DF apresentam aumento da expressão de P-selectina,

ativação de GPIIb/IIIa e altas concentrações de marcadores de ativação plaquetária, fator plaquetário 4 e β -tromboglobulina (Wun et al., 1998; Tomer et al., 2001). Estudos realizados em nosso laboratório mostram que plaquetas de pacientes com AF têm aumento das propriedades adesivas, apresentando uma adesão aumentada ao FB em ensaio de adesão *in vitro* (Canalli et al., 2006). Alguns estudos relatam que o número de plaquetas aumentadas e ativação da coagulação na DF estão associados com um estado de hipercoagulabilidade, o qual pode ter um importante papel no processo de vaso-oclusão (Ataga et al., 2007).

As células endoteliais participam na manutenção da hemostasia e produzem NO, gás vaso-dilatador que regula o tônus vascular, além de ser um importante inibidor da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais e da ativação dos leucócitos (Sonati e Costa, 2008). A Hb livre e a arginase, enzima que utiliza o substrato L-arginina na produção do NO, são liberados durante a hemólise crônica dos eritrócitos falciformes. O fenômeno da vasoconstrição, causado pela redução local de NO, é resultante do seqüestro deste gás e consumo do substrato e, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo, favorece o processo de falcização dos eritrócitos falciformes, aumenta a ativação plaquetária e a expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais (Conran et al., 2003; Zago e Pinto, 2007).

As interações moleculares, responsáveis pela adesão de hemácias falcizadas e pelos leucócitos ao endotélio, são mediadas por moléculas de adesão na superfície das células, como particularmente as integrinas e por VCAM-1, presentes nas células endoteliais. Nas células vermelhas as principais moléculas de adesão são a integrina (VLA-4) e o receptor de adesão CD36, enquanto nos leucócitos são as integrinas (Mac-1 e LFA-1), capazes de se ligarem aos componentes da matriz extracelular e às camadas endoteliais (Solovey et al, 2001).

1.1.4- Moléculas de Adesão

Embora o fenômeno de vaso-oclusão constitua um processo multifatorial e de múltiplos passos, o papel das células vermelhas tem sido estabelecido, e estudos anteriores tem demonstrado que eritrócitos falcizados aderem com maior facilidade à células endoteliais *in vitro* (Hebbel et al., 1980). Um número de moléculas de adesão conhecidas

por serem hiper-expressas em reticulócitos e eritrócitos, mediam essa adesão das células à microvasculatura. As mais estudadas têm sido o antígeno de ativação tardia (VLA-4; $\alpha_4\beta_1$; CD49d/CD29), CD36 e a molécula de adesão celular B-CAM/LU (Conran et al., 2009).

A VLA-4 é um membro da família das integrinas. As integrinas são proteínas de superfície celular, constituídas por duas cadeias α e β , que atuam como mediadores do processo inflamatório, exercendo papel importante nas etapas de adesão leucocitária, quimiotaxia, fagocitose, adesão endotelial e agregação (Yusuf-Makagiansar, 2001). Integrinas são os principais receptores pelos quais as células prendem-se a matriz extracelular (Smyth et al., 1993). VLA-4 é expressa em linfócitos, monócitos e células progenitoras da linhagem eritróide, mas não em eritrócitos maduros (Roseblatt et al., 1991). Swerlick et al.(1993) e Joneckis et al.(1993), demonstraram que VLA-4 é expressa em alto número na circulação de reticulócitos falciformes. Moléculas ligantes para VLA-4 incluem VCAM-1 e a fibronectina da matriz extracelular (Carlos et al., 1994). VCAM-1 é expresso no endotélio vascular e está exposto à circulação de reticulócitos falciformes expressando VLA-4, deste modo providenciando um mecanismo pelo qual células vermelhas falciformes podem aderir ao endotélio. A expressão de VCAM-1 no endotélio é regulada por citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) (Conforti et al., 1992). Reticulócitos falciformes demonstraram um aumento da aderência quando células endoteliais foram incubadas com TNF e a adesão foi inibida na presença de anticorpos para VCAM-1 e α_4 integrinas (α -subunidade de VLA-4) (Swerlick et al., 1993).

O CD36 é um receptor de adesão não pertencente à família das integrinas que liga com uma variedade de proteínas da matriz extracelular. Este receptor é mediador de adesão da integrina $\alpha_v\beta_3$ ao endotélio vascular via trombospondina (Conforti et al., 1992). A expressão de CD36 existente em células progenitoras da linhagem eritróide é perdida em células vermelhas maduras (Greenwalt et al., 1992; Okumura et al., 1992). Assim como VLA-4, o CD36 tem uma expressão anormal em reticulócitos falciformes circulantes. Acredita-se que CD36 e estas interações com trombospondina, são mecanismos potenciais pelos quais receptores de adesão podem contribuir para a vaso-oclusão na AF (Styles et al., 1997).

Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que as propriedades adesivas estão aumentadas em células vermelhas de indivíduos com AF, assim como a expressão

gênica e protéica das moléculas de adesão CD36 e VLA-4 (Gambero et al., 2006). Existem muitas evidências que os leucócitos tem um papel importante na DF e no processo de vaso-oclusão. Eles são encontrados em um estado ativado na circulação de indivíduos com DF (Assis et al., 2005). Os leucócitos podem facilitar a oclusão do vaso na DF por ligar-se ao endotélio vascular, um processo mediado por moléculas de adesão. Os leucócitos fixam-se firmemente ao endotélio via integrinas $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18) e $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18), os quais ligam-se com ICAM-1 nas células endoteliais (Okpala, 2006). Portanto, em neutrófilos, do sangue periférico são expressos os seguintes receptores de integrinas: VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$), LFA-1 e Mac-1. O VLA-4 é expresso em monócitos, linfócitos T e B, basófilos e eosinófilos, mas não em neutrófilos. Após ativação, os neutrófilos podem expressar a integrina VLA-4, cuja função é ancorar a célula ao endotélio por se ligar ao VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar, 2001).

Tanto o Mac-1 como o VLA-4 são conhecidos como importantes mediadores das funções quimiotáticas dos neutrófilos. O Mac-1 atua na degranulação e superoxidação de ânions, na produção de GM-CSF (fator estimulante de crescimento de colônias de macrófago-granulócitos) e de PAF (fator ativador de plaquetas) (Horie e Kita, 1994).

1.1.5- Quimiotaxia

Embora as alterações nas propriedades adesivas dos neutrófilos na DF sejam bem relatadas, a propriedades migratórias dessas células não tem sido exploradas na DF. A migração dos leucócitos do sangue para os sítios de injúria e inflamação é fundamental para a resposta inflamatória; entretanto, essa migração requer firme regulação, como infiltração celular dentro áreas saudáveis, o qual pode resultar em destruição do tecido (Petri e Bixel, 2006). O extravassamento de leucócitos através da parede do vaso sanguíneo envolve uma série de interações sucessivas com o endotélio. O recrutamento de leucócitos é iniciado pelo rolamento dessas células ao longo da parede vascular, processo mediado pelas selectinas. Esse estágio é seguido por firme adesão ao endotélio mediado por integrinas presente nos leucócitos, seguido pela migração da célula através do endotélio (Petri e Bixel, 2006). Estudos realizados por Canalli et al. (2007) mostraram que a capacidade quimiotática dos neutrófilos de pacientes com AF é significativamente maior que dos indivíduos controle.

1.1.6- Citocinas

Os processos vaso-oclusivos na microcirculação, infecções e hemólise são importantes fatores que estimulam a produção de citocinas e proteínas de fase aguda. O papel das citocinas na DF é alvo de contínuas pesquisas. As citocinas participam de vários mecanismos que podem contribuir para o processo de vaso-oclusão na DF, incluindo ativação do endotélio, indução da adesão dos leucócitos e células vermelhas ao endotélio, ativação de plaquetas, produção de endotelina-1 e alteração na apoptose endotelial (Makis et al., 2000).

O favorecimento das interações adesivas do endotélio e células vermelhas, leucócitos, e, possivelmente plaquetas são induzidos, por ativação pancelar que resulta em um aumento de citocinas e quimiocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator estimulador de colônia granulócítica- monocítica (GM-CSF), interleucina 8 (IL-8), IL-6, IL-1, IL-3, e fator estimulador de colônia macrofágica (Croizat, 1994; Gonçalves et al., 2001; Conran et al., 2004; Lanaro et al., 2009).

O receptor da integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) nos reticulócitos da DF pode ser ativado pela quimiocina IL-8. A IL-8 é produzida pelas células endoteliais em regiões de lesão endotelial e por leucócitos em regiões de inflamação. A produção de IL-8 é regulada por IL-1 e TNF- α , os quais são os principais estímulos na produção de quimiocinas. A fibronectina plasmática é uma proteína de fase aguda e sua síntese é regulada por IL-1 e IL-6. A expressão de VCAM-1, na superfície das células endoteliais, é induzida por citocinas inflamatórias como a IL-1 e TNF- α (Makis et al., 2000).

As plaquetas, estimuladas pela presença de citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), liberam múltiplos de von Willebrand, que favorecem as ligações entre plaquetas, endotélio e o eritrócito falciforme (Graido-Gonzales et al., 1998).

Os neutrófilos, ativados por essas mesmas citocinas, são recrutados para o sítio inflamatório, aumentam a produção de peróxidos e expõem maior quantidade de moléculas de adesão em sua superfície, facilitando a adesão ao endotélio, a outros neutrófilos, às plaquetas e aos eritrócitos falciformes, culminando com fenômenos vaso-oclusivos freqüentemente observados na DF (McIntyre et al., 2003).

Embora as alterações no número de citocinas inflamatórias, anti-inflamatórias e biomarcadores inflamatórios tenham sido relatados previamente, os dados tem sido conflitantes, e o papel das citocinas na AF ainda não foi bem elucidado. Trabalho realizado em nosso laboratório demonstrou que os níveis plasmáticos das citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-8 são maiores em pacientes SS em estado estável quando comparado com o grupo controle AA. Além disso, a expressão gênica dessas citocinas em células mononucleares é maior nesses indivíduos. Esses dados sugerem que alterações na expressão gênica e produção de citocinas/mediadores inflamatórios está presente na anemia falciforme (Lanaro et al., 2009).

1.1.7- Stress Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas continuamente nas células como produto do metabolismo. As ROS formadas dentro das células podem oxidar várias moléculas levando à morte celular e dano tecidual. Sua produção pode ser amplificada em resposta inflamação, desordens imunológicas, hipoxia, sobrecarga de ferro, metabolismo de drogas e álcool, exposição à UV e deficiências de vitaminas oxidantes, entre outros (De Zwart et al, 1999; Hershko et al., 1998; Chan et al., 1999).

A produção de ROS é controlada, sob condições fisiológicas normais, pela presença de enzimas antioxidantes (por exemplo a superóxido dismutase) e sequestradores de radicais de oxigênio, que previnem danos ao organismo. Uma excessiva produção de ROS pode ser prejudicial, superando a capacidade antioxidante e conduzindo a um desequilíbrio redox (Wood e Granger, 2007).

As ROS podem contribuir na patogênese de várias alterações hereditárias das células vermelhas, incluindo anemia falciforme, talassemia e deficiência de G6PD (Amer et al., 2003). O *stress* oxidativo representa o desequilíbrio entre o aumento da produção de ROS e a baixa capacidade celular antioxidante, tais como, redução de glutathione (GSH) e superóxido dismutase (SOD), os maiores sequestradores intracelulares de ROS (Amer et al., 2006).

A produção de ROS está aumentada por vários mecanismos na DF, que incluem o aumento da atividade de enzimas, tais como: NADPH oxidase (como resultado da leucocitose) e xantina oxidase endotelial. A HbS tem a capacidade de sofrer auto-oxidação

na presença de oxigênio para produzir superperóxido e radical hidroxila na hemácia SS. O processo de isquemia reperfusão na microcirculação pode produzir radicais livres de oxigênio (Conran et al., 2009). Além disso, um número de mecanismos de defesa de ROS é afetado na DF; baixos níveis/atividade de antioxidantes não enzimáticos, tais como, vitamina A, C e E, e antioxidantes enzimáticos, incluindo glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Com isso, o stress oxidativo resultante pode levar à rigidez e instabilidade da membrana da hemácia, que contribui para hemólise. Alguns dados sugerem que o stress oxidativo pode aumentar as propriedades adesivas de células vermelhas, plaquetas e leucócitos, e portanto, podem contribuir para o processo de vaso-oclusão (Schacter et al., 1988; Natta et al., 1990; Sultana et al., 1998; Amer et al., 2006; Kaul et al., 2004).

1.2- Talassemias β

As talassemias β (β tal) são um grupo de alterações moleculares causadas por redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias de globina β , levando a uma menor produção de hemoglobina, originando desta forma anemia de graus variados, de característica microcítica e hipocrômica (Weatherall e Clegg, 2001). Mutações no gene da globina β em heterozigose levam, com raras exceções, a uma anemia leve e assintomática denominada talassemia β menor. Mutações em homozigose, dependendo do grau de impedimento da síntese de globina, podem provocar anemia sintomática moderada (talassemia β intermediária), que pode exigir transfusões de eritrócitos apenas esporadicamente; ou formas graves (talassemia β maior) que são sintomáticas e exigem regime transfusional mensal, na maioria dos casos. Mutações no gene da globina β que suprimem totalmente a síntese são chamadas de Beta Zero (β^0). Mutações em que existe alguma síntese de cadeia de globina β são chamadas de Beta Mais (β^+) (Thein, 1998).

1.2.1- Formas Clínicas da Talassemia Beta

O diagnóstico da talassemia β é realizado a partir de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, é embasado fundamentalmente na gravidade da anemia que se apresenta

microcítica e hipocrômica nas três formas de talassemias β : menor, intermediária e maior (Cao et al., 1997).

Talassemia β menor: também denominado traço talassêmico, são heterozigotos clinicamente assintomáticos e habitualmente não necessitam de tratamento apesar de apresentar microcitose, hipocromia e níveis de hemoglobina levemente abaixo dos níveis normais. Embora o defeito possa ser detectado por exames laboratoriais específicos, é freqüentemente confundida com anemia por carência de ferro (Zago, 2004).

Talassemia β intermediária: essa denominação reserva-se para casos sintomáticos que espontaneamente mantêm níveis de hemoglobina de 6-9 g/dl, que não dependem de transfusões regulares (Zago, 2004).

Talassemia β maior: é resultante de homozigose ou heterozigose composta para os genes da globina β , e corresponde à forma mais grave da doença, dependente de transfusão, com quadro clínico composto de anemia intensa, esplenomegalia, deformidades ósseas e graves alterações no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução. As manifestações surgem durante o primeiro ano de vida com menor aumento de peso, episódios de febre, diarreia, apatia, irritabilidade e palidez (Weatherall e Clegg, 2001). A maioria dos pacientes necessita de transfusões regulares, a cada 3 ou 4 semanas, seguidas de um regime de quelação do excesso de ferro. Este regime de transfusão/quelação deve ser iniciado o mais precocemente possível, para evitar deformidades ósseas e danos ao pâncreas, fígado, miocárdio e outros órgãos (Weatherall, 1990).

A definição entre talassemia maior ou intermediária é fundamental na prática clínica, pois define o tipo de tratamento que o paciente receberá. No entanto, essa distinção nem sempre é fácil, uma vez que o quadro clínico pode ser resultante de grande número de combinações moleculares (Weatherall, 1990).

1.2.2- Talassemia β Intermediária

Uma forma de talassemia β é clinicamente definida como intermediária, quando se revela como uma anemia crônica moderada com níveis de hemoglobina entre 6 e 9g/dl, que se mantém espontaneamente sem necessidade transfusional contínua e na presença de esplenomegalia. Geralmente, o início dos sintomas e o reconhecimento da anemia ocorrem mais tardiamente, em geral, após o segundo ano de vida (Weatherall, 1990). Portanto, a

definição de talassemia intermediária subentende um diagnóstico clínico que envolve um amplo espectro de fenótipos em dois extremos, em que se distingue desde formas leves até formas graves. Formas leves podem permanecer assintomáticas e bem toleradas até a idade adulta quando, geralmente, se apresentam com marcada hepatoesplenomegalia e sinais de hiperesplenismo (Ho et al., 1998).

Entre os dois extremos da talassemia intermediária coloca-se um espectro de quadros clínicos de gravidade variável, que parecem depender basicamente de um mecanismo principal que é a eritropoese ineficaz, que por sua vez é fruto do desequilíbrio da síntese de globinas α e β (Ho et al., 1998).

Baseado nesse pressuposto fisiopatológico há uma tendência imediata em se pensar que um fenótipo intermediário seja ligado a vários genótipos talassêmicos. Nos últimos anos, com aquisição de conhecimentos moleculares, foram feitas várias tentativas de relacionar manifestações clínicas com mutações e outros arranjos moleculares que pudessem, de alguma forma, traduzirem-se na expressão do fenótipo (Ho et al., 1998). É o caso de certas mutações leves no gene β globínico (β^+ ou β^{++}) que se caracterizam por uma menor redução na síntese de globina β levando, conseqüentemente, a uma menor quantidade de cadeias α livres. Os exemplos que com maior freqüência estão relacionados com quadros de talassemia intermediária são as mutações -101 (C $\rightarrow$ T), -87 (C $\rightarrow$ T), -88 (C $\rightarrow$ T), -29 (A $\rightarrow$ G) e a IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (Forget, 2001).

A caracterização clínico-laboratorial da talassemia β intermediária é freqüentemente dificultada pela grande variabilidade da sintomatologia e dos dados hematológicos dos pacientes. A correlação entre a apresentação clínica e as mutações tem sido uma dificuldade para vários pesquisadores (Cao et al., 1994). Por outro lado, a talassemia intermediária é uma forma clínica de menor gravidade que a talassemia maior, que resulta geralmente da combinação dos seguintes defeitos genéticos:

- Homozigose para genes β^+ talassêmicos de menor gravidade (como IVS-I-6);
- Combinação do gene β talassêmico grave com talassemia β^+ particularmente benigna (como β talassemia “silenciosa”);
- Associação de $\delta\beta$ com β^+ talassemia;

- Presença de um defeito adicional que reduz o excesso de cadeias α (como a co-herança de talassemia α) ou que aumenta a produção de cadeias γ (PHHF);
- Heterozigose para gene talassêmico β particularmente grave. Em geral, o heterozigoto β talassêmico é assintomático, mas raramente o defeito é suficientemente grave para determinar manifestações clínicas;
- Heterozigose para gene talassêmico β com genes α extras;
- Talassemia β dominante (variantes de cadeia β hiperinstável).

Zago (2004), Thein (2005) e outros observaram considerável variação nos fenótipos clínicos resultantes dessas interações moleculares.

No estado de Pernambuco, a talassemia tende a ter um quadro clínico mais brando, devido à predominância da mutação β^{+Leve} IVS-I-6 (T→C) (Araújo et al., 2003), sendo encontrada em 54,9% dos alelos (Bezerra, 2007). Essa mutação, em homozigose, causa um quadro clínico β talassêmico intermediário, descrito, concomitantemente em Portugal (com o nome de “ β talassemia portuguesa”) e no Brasil em uma família de descendentes de portugueses (Tamagnini et al., 1983; Costa et al., 1991). A segunda mutação mais freqüente no estudo foi a IVS1-5 (G→C), previamente descrita no Brasil por Araújo et al, (2003). Essa mutação está presente em 15,2% dos alelos (Bezerra, 2007), resulta em talassemia β^{+Grave} com marcante redução da quantidade de RNA_m normal, e é tida como a mutação de maior prevalência no sub-continente indiano (Forget, 2001; Tuzmen e Schechter, 2001). Enquanto nas regiões Sudeste e Sul a doença tem origem predominantemente italiana, sobressaindo-se a mutação β^0 códon 39 que causa uma forma mais grave da doença, em PE essa mutação têm uma frequência de 7,7% (Bezerra, 2007).

1.2.3- Fisiopatologia da talassemia β intermediária

As complicações clínicas da talassemia intermediária são decorrentes de três processos principais: eritropoese ineficaz, anemia crônica e sobrecarga de ferro. A gravidade clínica depende primariamente do defeito molecular no gene β . A diminuição da síntese de cadeias β leva a um desequilíbrio com as cadeias alfa. Excessos de cadeias alfa são extremamente instáveis e precipitam nos precursores eritroídes da medula óssea, formando corpos de inclusão, que causam danos à membrana e morte celular, levando à

eritropoese ineficaz (Olivieri, 1999). É importante enfatizar que, quanto menor for o desequilíbrio da síntese das globinas, menor será a taxa de globinas α livres que precipitam dentro da hemácia e, conseqüentemente, menor será a taxa de eritropoese ineficaz, o grau de anemia e suas complicações clínicas (Camashella e Cappellini, 1995). A eritropoese leva a uma tal expansão medular, que ocupa a matriz óssea e provoca osteoporose e deformidades ósseas. O *stress* eritropoético a que a medula é constantemente imposta pode determinar compressão por massas eritropoéticas em vários locais, prevalentemente intravertebrais, mas também no fígado ou intra-raqueanas (Camashella e Cappellini, 1995). O nível de eritropoese ineficaz é o determinante primário no desenvolvimento da anemia. A anemia crônica leva a um aumento da absorção gastrointestinal de ferro, resultando em sobrecarga de ferro, que pode ser a causa de várias complicações sérias, incluindo cardiopatia e anormalidades endócrinas, tais como diabetes mérito e hipogonadismo (Taher et al., 2006).

São poucos os estudos sobre as propriedades adesivas das células de pacientes talassemia β . Estudo realizado em pacientes com talassemia β maior e intermediária mostraram que as células vermelhas desses pacientes apresentaram uma aderência aumentada às células endoteliais (Hovav et al., 1999). No entanto, a capacidade quimiotática de neutrófilos de pacientes com talassemia maior é menor em relação a neutrófilos de indivíduos normais (Matzner et al., 1993; Palácios et al., 1993; Ktukculer et al., 1996). Estudos realizados com hemácias de pacientes com talassemia β maior demonstram uma maior produção de ROS quando comparado com hemácias de indivíduos normais, assim como uma diminuição dos mecanismos antioxidantes pela GSH e SOD (Amer et al., 2003; Amer et al., 2004; Dhawan et al., 2005).

1.3- Justificativa

A hemoglobina C e a talassemia β são extremamente frequentes no estado de Pernambuco, dessa forma, é comum encontrarmos associação dessas alterações com o gene da HbS, resultando em quadros clínicos de doença falciforme com alta morbidade e heterogeneidade fenotípica. Nessa população, a talassemia β intermediária aparece como a forma clínica predominante do estado homozigoto da doença devido à alta frequência da mutação $\beta^+IVS-I-6$ (T $\rightarrow$ C). Que seja de nosso conhecimento, os estudos prévios sobre as

propriedades adesivas, atividade quimiotática, expressão protéica de moléculas de adesão e *stress* oxidativo, são restritos à forma homozigota do gene da HbS (SS). Dessa forma, a avaliação das propriedades adesivas e funcionais de células vermelhas, neutrófilos e plaquetas de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β intermediária, é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos que possam contribuir com o esclarecimento da fisiopatologia e a variabilidade clínica nessas hemoglobinopatias.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a capacidade adesiva de células vermelhas, neutrófilos e plaquetas, quimiotaxia dos neutrófilos, as citocinas inflamatórias e o *stress* oxidativo nas hemoglobinopatias (doenças falciformes e talassemia β).

Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade adesiva das células vermelhas, neutrófilos e plaquetas de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β -intermediária;
- Determinar a capacidade quimiotática dos neutrófilos na hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β -intermediária;
- Determinar a expressão das moléculas de adesão VLA-4 e CD36 na superfície das células vermelhas e VLA-4, Mac-1 e LFA-1 na membrana de neutrófilos de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β -intermediária;
- Determinar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células vermelhas, neutrófilos e células mononucleares de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β -intermediária;
- Determinar a atividade da superóxido dismutase (SOD) no plasma de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β -intermediária;
- Dosar a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/ β -talassemia e talassemia β -intermediária.

Pacientes e Métodos

3.1- Pacientes e Controles

Para o estudo realizado foram selecionados pacientes com DF: anemia falciforme (SS), hemoglobinopatia SC (SC), 3 grupos com a interação S/β talassemia: S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) e talassêmicos intermediários (TI) homozigotos para a mutação IVS-I-6 (T→C) diagnosticados no Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE), através de eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e as mutações no gene da globina β foram identificadas por seqüenciamento, utilizando *primers* específicos que flanqueiam o gene, realizado no equipamento MegaBACE 1000 (GE Healthcare - Amersham). Estes pacientes apresentavam idade entre 18-60 anos, encontravam-se em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios, sem transfusão sanguínea por pelo menos três meses e sem crises de dor por este mesmo período e sem terapia com hidroxiuréia. As amostras de indivíduos controle consistiram de voluntários sadios com idade de 18-50 anos que tiveram a amostra submetida a HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) para confirmação da normalidade do padrão eletroforético AA. Todos os participantes deste estudo leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os valores hematimétricos dos controles encontram-se dentro da normalidade. Foram estudados um total de 106 pacientes, sendo divididos conforme a tabela 1 e 25 controles AA.

Tabela 1: Dados hematológicos dos pacientes com DF e talassêmicos intermediários que participaram do estudo. Os valores estão expressos como média (valor mínimo – valor máximo).

	SS n=20	SC n=20	S/β-IVS-I-6 n=18	S/β-IVS-I-5 n=16	S/β-Cd39 n=12	TI n=20
Sexo	10 H / 10M	8 H / 12M	9 H / 9 M	7 H / 9 M	6 H / 6M	8 H / 12 M
Idade (anos)	30 (23-39)	28 (18-55)	28 (20-38)	24 (18-35)	34,5 (24-59)	40,9 (18-60)
RBC (10⁶mm³)	2,46 (1,94-3,41)	4,05 (3,29-5,58)	5,10 (4,64-5,61)	3,64 (2,72-4,56)	3,55 (2,74-4,11)	3,91 (3,17-4,95)
Hb (g/dL)	7,4 (6,3-8,8)	10,9 (9,4-13,2)	11,6 (10,1-12,8)	7,4 (6,3-9,2)	7,8 (6,0-9,6)	7,6 (6,8-8,9)
VCM (fL)	94,3 (84,5-107,7)	85,4 (77,7-92,4)	73,3 (67,2-77,2)	68,7 (61,1-76,8)	73,0 (66,2-76,3)	66,7 (50,6-76,0)
Ret (%)	8,6 (4,3-15,6)	3,8 (1,5-7,0)	2,7 (1,0-4,4)	8,8 (4,1-20,0)	8,7 (2,6-13)	8,2 (2,5-15,0)
HbS (%)	89,9 (85,7-92,5)	49,5 (48,1-53,1)	67,4 (64,6-70,1)	72,9 (64,0-85,9)	84,5 (72,5-88,7)	-
HbF (%)	6,9 (3,4-11)	1,3 (0,3-3,6)	1,8 (0,3-3,9)	17,6 (8,1-24,8)	11,0 (6,8-23,8)	10,9 (3,9-20,8)
HbA (%)	-	-	26,3 (23,3-28,3)	5,2 (3,5-8,7)	-	83,0 (72,1-89,5)

3.2- Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE e aprovado sob o nº 030/2007, homologado em 19 de dezembro de 2007, de acordo com o previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo I).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deste estudo foi aprovado pelos conselhos citados e todos os participantes deste estudo o assinaram.

3.3- Separação de Plasma

As amostras de sangue de indivíduos controle e pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) e TI foram coletadas em tubo de EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) e centrifugadas a 1000g por 15 minutos, em seguida o plasma coletado foi aliquoteado e armazenado -80°C até a realização dos ensaios.

3.4- Dosagem Plasmática de Citocinas Inflamatórias

As citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, e TNF- α) foram dosadas por meio de kit comercial de ELISA (Quantikine ELISA Kits, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) em amostras de indivíduos controles e pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) e TI. Para a dosagem plasmática das citocinas IL-1 β , IL-6e TNF- α foram utilizados kits de alta sensibilidade.

3.5- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD foi determinada no plasma por meio de kit comercial colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) em amostras de indivíduos controles e pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) e TI.

3.6- Isolamento de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico

As amostras de sangue total de indivíduos controles e pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) e TI foram coletadas em tubos de heparina lítica (9mL) e colocada sobre duas camadas de Ficoll-Hypaque de densidades de 1.119 g/L e 1.077 g/L, respectivamente. Após separação das células mononucleares e granulócitos por centrifugação a 700g por 30 minutos, as células foram lavadas em PBS (1X) pH 7,4. As hemácias contaminantes foram lisadas com tampão de lise (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ 15 minutos 4°C) e lavadas novamente em PBS (1X) antes do uso nos experimentos posteriores.

Para a adesão estática de neutrófilos e quimiotaxia *in vitro*, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (pH 7,2) em uma concentração de 2x10⁶ células/mL e

4×10^6 células/mL, respectivamente. As células foram mantidas à 4°C até o prosseguimento do experimento.

Para determinação da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) as células mononucleares e granulócitos foram ressuspensas em PBS (1X) em uma concentração de 1×10^6 células/mL.

3.7- Separação de Células Vermelhas

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com citrato de sódio e centrifugadas por 10 minutos a 500g para remoção do plasma e buffy coat. As células foram lavadas 3 vezes sendo ressuspensas em PBS (Salina fosfatada tamponada) e centrifugadas a 700g, 600g e 480g respectivamente, sendo então, ressuspensas com 1 mL de PBS para contagem de células vermelhas no contador automático Cell-Dyn 1700 (ABBOT, IL, USA). A concentração final foi ajustada para 4×10^8 cel/mL.

Para determinação da produção de ROS, as células células vermelhas foram ressuspensas em PBS (1X) em uma concentração de 1×10^6 células/mL.

3.8- Separação de Plaquetas

As amostras de sangue periférico (12mL) foram coletadas em EDTA de indivíduos controles e pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) e TI e centrifugadas por 15 minutos a 200g a 20°C. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi adicionado a um tampão de lavagem (140 mM NaCl / 0.5 mM KCl / 12 mM citrato de sódio / 10 mM glicose / 12.5 mM sacarose, pH 6) e centrifugado por 12 minutos a 800 g a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de plaquetas ressuspendido, gentilmente, com 500 μ l de solução de Krebs (118 mM NaCl / 25 mM NaHCO₃ / 1.2 mM KH₂PO₄ / 1.7 mM MgSO₄ / 5.6 mM glicose, pH 7.4). O número de plaquetas foi ajustado para $1,2 \times 10^8$ plaquetas/mL na presença de 1 mM CaCl₂.

3.9- Ensaio de Adesão Estático de Neutrófilos

Placas com 96 poços foram recobertas com 60 μ L do ligante fibronectina (20 μ g/mL de FN em PBS) por 16-20 horas à 4°C. Os poços da placa foram lavados duas vezes com PBS antes de bloquear os sítios inespecíficos com PBS/BSA 0,5% por 90

minutos à 37°C. Depois de lavar a placa mais duas vezes com PBS e secá-las, os neutrófilos foram adicionados num volume de 50µL em RPMI 1640 (2×10^6 células/mL) e incubados durante 30 minutos (37°C, 5% CO₂) para permitir a adesão (tempo ideal para adesão celular à FN). Após incubação, as células não aderidas foram removidas com 2 lavagens de PBS. Por fim, foi colocado um volume de 50µL de meio de cultura RPMI nos poços onde foi realizado o ensaio de adesão. Esse mesmo procedimento foi realizado com os neutrófilos de indivíduos controles e pacientes SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) e TI.

Para mensurar os neutrófilos que aderiram à FN, foi realizada uma curva padrão. Para construir a curva, foram adicionadas concentrações que variavam de 0-100% da suspensão original de células (2×10^6 células/mL) em 50µL de RPMI.

As placas foram congeladas por ao menos 12 horas antes de medir o conteúdo de mieloperoxidase (MPO) encontrado tanto nas células da curva padrão como nas células aderidas do ensaio (Bradley et al., 1982). Em resumo, as placas foram descongeladas em gelo e a MPO foi extraída, das células aderidas e das células da curva padrão, com hexadeciltrimetil amônio bromida (HTAB), 0,5% em tampão fosfato de potássio, 50mM, pH 6,0. Vinte microlitros da HTAB de cada poço foi misturado com 200 µL de solução de o-dianisidina (*o-dianisidine dihydrochloride* 0,167 mg/mL, peroxidase de hidrogênio 0,0005% em tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0) e a absorbância foi medida, depois de 5 minutos, a 490nm usando leitor de ELISA (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação das absorbâncias das amostras desconhecidas com às da curva padrão.

3.10- Quimiotaxia *in vitro* de Neutrófilos

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados em neutrófilos obtidos de pacientes SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) e TI, além dos indivíduos controles. Este ensaio foi realizado usando-se câmara de microquimiotaxia com 96 poços (Chemo Tx ®, Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA), na qual foram adicionados 29 µL de RPMI no compartimento inferior da câmara. Em seguida foi cuidadosamente colocado o sistema de filtro (os dois compartimentos foram separados com filtro de

policarbonato com poro de 5 μm) e sobre este foram adicionadas alíquotas (25 μL) da suspensão de neutrófilos (4×10^6 células/mL em meio RPMI), para avaliar a quimiotaxia espontânea. A câmara foi incubada por 2 horas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C e, em seguida, procedeu-se a retirada das células não-migradas presentes no compartimento superior da câmara com o auxílio de um lenço de papel, e as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1200 rpm a temperatura ambiente e os filtros foram removidos. Em seguida, o conteúdo dos poços ressuspensos e transferidos para outra placa, que foi então congelada e destinada à dosagem do conteúdo de mieloperoxidase (MPO) (Bradley *et al.*, 1982).

As placas foram descongeladas e mantidas em banho de gelo. A seguir, cada poço recebeu 14,5 μL de hexadeciltrimetil amônio bromida (HTBA) em 50 mM de tampão fosfato potássio, pH 6.0. O conteúdo dos poços foi ressuspensão, e 10 μL de cada amostra foram transferidos para outra placa e adicionou-se 190 μL da solução de o-dianisidina (0.167 mg/mL o-dianisidina dihidrocloride, 0.0005% peróxido de hidrogênio em 50 mM de tampão fosfato, pH 6.0). A placa foi incubada por 5 minutos e a leitura da absorbância foi determinada em 490 nm em leitor de microplaca (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A curva padrão foi construída utilizando-se 2×10^6 neutrófilos/mL como o maior ponto da curva. A quantidade de células migradas foi calculada comparando-se as absorbâncias desconhecidas com a curva padrão. Em cada experimento, os ensaios foram sempre realizados em triplicata.

3.11- Ensaio de Adesão Estático de Células Vermelhas

Placas com 96 poços de fundo plano foram preparados por *coating* individual com 60 μL de fibronectina (20 $\mu\text{g/mL}$ de FN em PBS; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) *overnight* à 4°C . Os poços da placa foram lavados três vezes com 100 μL de PBS. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 150 μL de PBS/BSA a 1% por 90 minutos à 37°C . Os poços foram lavados novamente por mais três vezes com 100 μL de PBS. Depois de secos, adicionamos em 3 poços na placa, um volume de 50 μL da solução celular contendo 2×10^8 cel/mL células vermelhas para a adesão basal, em meio Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; GIBCO BRL, Life Technologies).

A incubação foi realizada por um tempo de 30 minutos, que foi estabelecido como tempo ideal para que as células respondam aos estímulos causados pelos componentes

estudados, à 37°C e 5% CO₂. Após a incubação, os poços foram lavados gentilmente por três vezes com 100 µL de PBS, para que as células não aderentes fossem desprezadas. Por fim colocamos 50 µL de meio HBSS em cada poço, para evitar que as células aderidas sofressem desidratação.

Para mensurar a quantidade de células vermelhas que aderem à FN, realizamos uma curva padrão. Para construir a curva, adicionamos, em duplicata, concentrações crescentes em relação a suspensão inicial de células (2×10^8 células/mL), onde o 0% é formado apenas de meio HBSS e o 100% apenas de solução original de células.

A solução de revelação utilizada no ensaio de adesão é a solução de DRABKIN (Sigma Chem. Co., St Louis, USA), que é um reagente muito utilizado na rotina hematológica, contendo cianeto e ferrocianeto de potássio. Esse reagente tem a propriedade de lisar as células vermelhas e expor a hemoglobina presente nessas células. Após isso há a oxidação da hemoglobina e metahemoglobina em cianometahemoglobina. A intensidade de cor desse composto se mede colorimetricamente, permitindo assim a leitura em comprimento de onda de 540nm.

A cada poço (reação de adesão e curva padrão) foi adicionado 50 µL da solução de DRABKIN. Após 5 minutos de incubação à 37°C, a leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA a 540nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA). A aderência foi calculada por comparação da absorbância das amostras desconhecidas com a absorbância da curva padrão que apresenta concentrações celulares conhecidas.

3.12- Ensaio de Adesão Estático de Plaquetas

O ensaio de adesão foi realizado de acordo com Bellavite, *et al.* (1994). Placas com 96 poços foram preparadas por *coating* individual com 50 µg/mL de fibrinogênio (Sigma, St. Louis, EUA) incubadas por 18 h à 4 °C. Os poços foram lavados duas vezes com solução de Krebs e os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de Krebs e BSA 1% (USBiological) durante 60 minutos à 37°C. As placas foram lavadas novamente como descritas anteriormente, e os ensaios foram realizados em triplicata; 50 µL de suspensão de plaquetas foram adicionadas a cada poço da placa com ligante (15 minutos à 37°C). Após a incubação, as plaquetas não aderentes foram desprezadas, e a placa foi lavada duas vezes com solução de Krebs. Em seguida, foram adicionados 50 µL de Krebs e

150 µL do substrato da fosfatase ácida (0.1 M tampão citrato; pH 5.4; 5 mM p-fosfato de nitrofenila e 0.1% de Triton X-100, Sigma), em cada poço, e incubados por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Para interromper a reação foram adicionados 100 µL de NaOH (2N) em cada poço. O resultado foi obtido no leitor de ELISA com comprimento de onda de 405 nm (Multiscan MS, Labsystems, EUA), e calculado em porcentagem de plaquetas aderidas a partir da comparação das absorbâncias dos poços com uma curva padrão, formada por diluições da suspensão original de plaquetas.

3.13- Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo consiste no reconhecimento de proteínas *in situ*, com um anticorpo marcado com um fluorocromo, comumente ficoeritrina (PE) ou fluoresceína isotiocianato (FITC). Estes fluorocromos ao serem estimulados por um feixe de laser emitem um fóton que é captado por sensores no aparelho. O citômetro de fluxo faz análises qualitativas (quantas células expressam este produto) e quantitativas (quanto de certo produto é expresso por célula) da mesma amostra (Owens e Loken, 1995).

3.14- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão de Células Vermelhas

A expressão das moléculas de adesão na superfície das células vermelhas de pacientes SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) e TI, além dos indivíduos controles foi detectada por citometria de fluxo. Para marcação de antígenos de superfície celular, 5 µL de sangue total coletado em tubo com EDTA foram ressuspensos em 95 µL de PBS e incubados com 3 µL de anti-VLA-4 subunidade α, CD 49d, clone 44H6, (SEROTEC; Oxford, UK) ou 2 µL de anti CD 36, clone CLB-IVC7, (SANQUIN; Amsterdam, Netherlands), conjugados ao FITC. Outra marcação utilizada para as células vermelhas foi a do anticorpo anti-receptor de transferrina – CD 71 (3 µL), clone T56/14 (CALTAG, Burlingam) conjugado com FITC, que é um marcador de células vermelhas imaturas, para assim verificarmos a expressão das moléculas de adesão em células maduras e imaturas. E como controle negativo foi utilizado um isotipo negativo (IgG1 3 µL, CALTAG, Burlingam) conjugado com FITC e PE. Essa solução de células com anticorpos foi incubada por 30 min, 4°C, na ausência de luz.

Às células devidamente marcadas foram adicionados 500 µL de PBS e centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso em 2 mL de PBS e conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição no citômetro (FACS-calibur, Becton-Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA, USA).

3.15- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão de Neutrófilos

A expressão das moléculas de adesão (LFA-1, Mac-1 e VLA-4) na superfície dos neutrófilos de pacientes SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) e TI, além dos indivíduos controles foi detectada por citometria de fluxo. Os neutrófilos isolados (1×10^6 células/mL) foram incubados com 3 µL de anti CD11a conjugado com FITC (SEROTEC; Oxford, UK); 3 µL de anti CD49d conjugado com FITC (SEROTEC; Oxford, UK) e 3 µL de anti CD11b conjugado com R-PE (SEROTEC; Oxford, UK) e como controle negativo isotipo IgG (3 µL) (CALTAG, Burlingam) por 30 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz.

Às células devidamente marcadas foram adicionados 500 µL de PBS e centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso em 500 µL de PBS e conservadas a 4°C, ao abrigo da luz, até a hora da aquisição no citômetro.

Os eventos foram adquiridos no citômetro (FACS-calibur, Becton-Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA, USA) a 488 nm. As análises foram realizadas na região de neutrófilos, baseada nas características de complexidade citoplasmática (SSC) e tamanho celular (FSC). Em seguida, a média de intensidade de fluorescência (MFI) para cada antígeno foi aferida e utilizada para comparação de expressão do antígeno em relação às células incubadas com um anticorpo controle negativo (isotipo controle). Foram comparadas a positividade de células controle em relação à positividade das células dos pacientes em relação aos anticorpos descritos acima.

3.16- Determinação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As amostras de células vermelhas, granulócitos e células mononucleares de pacientes e controles foram ressuspendidas em PBS (1X) para ajuste da concentração de

1×10^6 células/mL. As células foram incubadas com 0,5µL de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen, Life Technologies). O DCFH-DA difunde-se para dentro das células, e no citosol é deacetilado por esterases intracelulares, produzindo um composto não fluorescente DCFH. A oxidação do DCFH por ROS produz um composto altamente fluorescente 2,7 diclorofluoresceína (DCF). Por quantificação da fluorescência, a produção de ROS pode ser quantificada (Amer et al., 2003; Amer et al., 2004).

Após incubação das células vermelhas (30 minutos); granulócitos e células mononucleares (15 minutos) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, as células foram centrifugadas (5 minutos a 1600 rpm) lavadas e ressuspensas em PBS (1X). A produção das ROS foi analisada por citometria de fluxo (FACS-calibur, Becton-Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA, USA) com aquisição de 10.000 eventos, utilizando o programa CellQuest para análise da intensidade média de fluorescência (MFI).

3.17- Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e os dados de cada grupo (indivíduos controle e pacientes) foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com uma significância estabelecida de $p < 0,05$. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Instat.

Resultados

4.1- Adesão Estática *in vitro* de Neutrófilos de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

A adesão espontânea dos neutrófilos foi realizada em placas recobertas com fibronectina (FN). Os neutrófilos de pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) mostraram uma adesão significativamente maior à FN (20 μ g/mL), quando comparado com os neutrófilos de indivíduos controle (P<0,05). Os grupos S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) e S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) mostraram um menor aumento na adesão de neutrófilos à FN quando comparados com o grupo SS (P<0,05) (Figura 2).

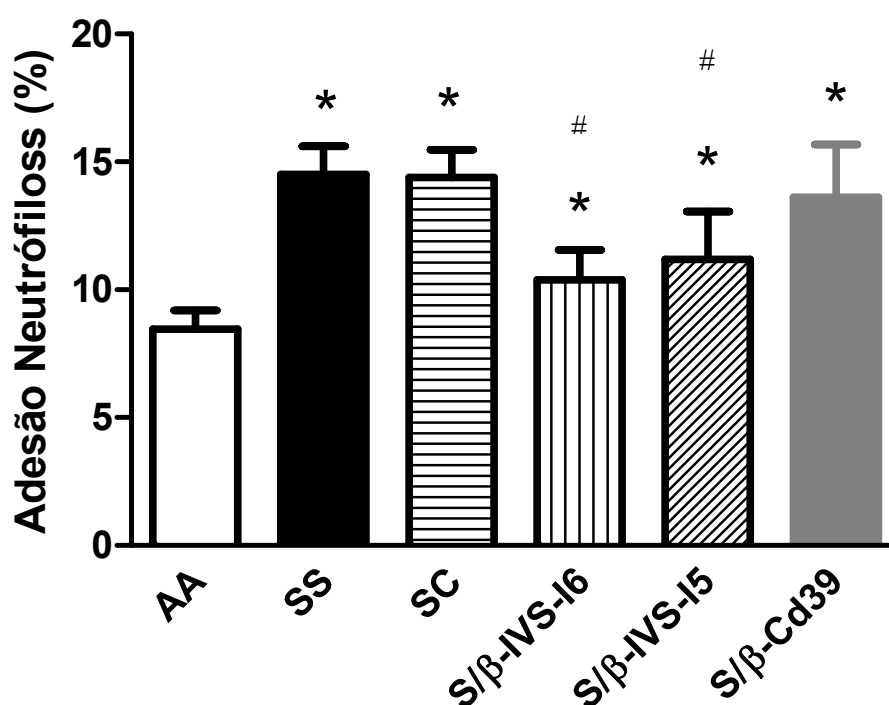


Figura 2: Adesão basal de neutrófilos isolados de indivíduos controle e pacientes SS (n=12), SC (n=20), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=17), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=15) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) (n=9) à FN. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de células aderidas $\pm$ erro médio padrão (EPM). Os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 comparado com o grupo AA (n=20); #P<0,05 comparado com o grupo SS.

4.2- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão dos Neutrófilos de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

A expressão das integrinas VLA-4 (CD49d), Mac-1 (CD11b) e LFA-1 (CD11a) (α -subunidade) na superfície dos neutrófilos de indivíduos controle e pacientes SS, SC, S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) foi avaliada por citometria de fluxo.

Na tabela 2 estão apresentados, o valor da média e os EPM da porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o percentual de células positivas das subunidades de integrinas CD11a, CD11b e CD49d em neutrófilos de pacientes SS, SC e os 3 grupos S/ β em relação ao grupo controle AA.

Tabela 2: Expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos neutrófilos de indivíduos controle (AA) e pacientes com DF, determinados por citometria de fluxo. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média do percentual de células positivas.

	CD11a (%)	CD11b (%)	CD49d (%)
AA	99,55 $\pm$ 0,12	98,00 $\pm$ 1,79	2,26 $\pm$ 0,30
SS	99,86 $\pm$ 0,02	99,50 $\pm$ 0,36	2,82 $\pm$ 1,08
SC	99,78 $\pm$ 0,06	99,50 $\pm$ 0,05	2,92 $\pm$ 0,34
S/ β -IVS-I-6	98,21 $\pm$ 0,56	81,10 $\pm$ 4,90	3,81 $\pm$ 0,73
S/ β -IVS-I-5	95,60 $\pm$ 1,20	84,80 $\pm$ 5,90	4,28 $\pm$ 0,95
S/ β -Cd39	98,25 $\pm$ 0,42	94,20 $\pm$ 1,30	3,22 $\pm$ 0,55

Grupos: SS (n=10), SC (n=14), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=17), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=12), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) (n=9) e Controle AA (n=20).

4.3- Capacidade Quimiotática *in vitro* de Neutrófilos de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

O ensaio de quimiotaxia *in vitro* para avaliação da capacidade quimiotática dos neutrófilos, demonstrou que somente os neutrófilos de pacientes dos grupos SS e SC apresentaram uma migração espontânea (na ausência de estímulo quimiotático) significativamente maior que os neutrófilos de indivíduos controle ($P<0,05$). O grupo S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) apresentou uma menor capacidade quimiotática dos neutrófilos em relação ao grupo SS ($P<0,05$) (Figura 3).

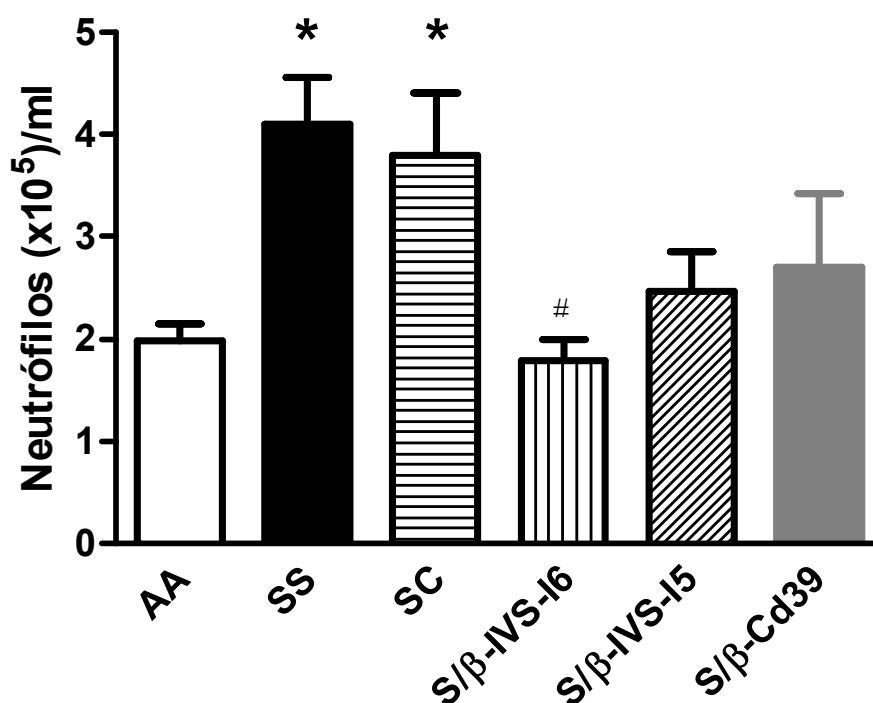


Figura 3: Quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos de indivíduos controle (AA) e de pacientes SS (n=15), SC (n=15), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) (n=12), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) (n=12) e S/ β -Códono39 (C $\rightarrow$ T) (n=8). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo AA (n=15); # $P<0,05$ comparado com o grupo SS.

4.4- Adesão Estática de Células Vermelhas de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

A adesão estática das células vermelhas de pacientes SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) foi realizada em placas recobertas com FN. As células vermelhas dos grupos SS e SC apresentaram maior adesão à FN do que as células de indivíduos controle ($10,12 \pm 1,20$; $9,30 \pm 0,86$; $4,83 \pm 0,45$, respectivamente; $P < 0,05$), e que há uma diferença significativa entre a adesão das células vermelhas de pacientes SS e a adesão das células vermelhas dos 3 grupos de pacientes com S/β talassemia ($P < 0,05$) (Figura 4).

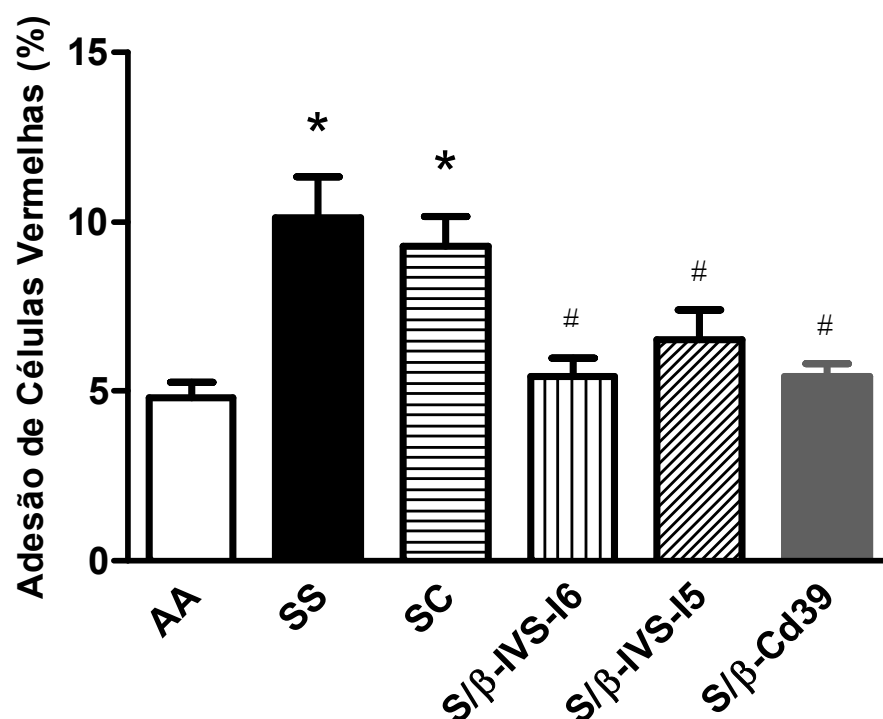


Figura 4: Adesão basal de células vermelhas de indivíduos controle (AA) e células vermelhas de pacientes SS (n=10), SC (n=15), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=14), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=15) e S/β-Códon39 (C→T) (n=8) à FN. Os valores estão representados pela média $\pm$ EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata. * $P < 0,05$ comparado com o grupo AA (n=18); # $P < 0,05$ comparado com o grupo SS.

4.5- Expressão Protéica de CD49d, CD36 e CD71 em Células Vermelhas de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

A expressão das moléculas de adesão (CD49d, CD36 e CD71) nas células vermelhas foi avaliada por citometria de fluxo.

Na tabela 3 estão representados, o valor da média e os EPM da porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados. Todos os grupos de DF apresentaram um número significativamente maior de células vermelhas CD36 positivas em relação às células vermelhas de indivíduos controle ($P<0,05$), assim como o percentual de células positivas para o marcador de células vermelhas imaturas CD71. Todos os grupos de DF apresentaram um número significativamente maior de células vermelhas CD49d positivas em relação às células vermelhas de indivíduos controle ($P<0,05$), exceto o grupo S/β-IVS-I-6 (T→C).

Tabela 3: Porcentagem da população de células positivas (%) para as moléculas estudadas, em células vermelhas de indivíduos controles e de pacientes SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T). Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

	CD36 (%)	CD49d (%)	CD71 (%)
AA	0,38 ± 0,10	0,11 ± 0,02	1,95 ± 0,30
SS	1,97 ± 0,90*	1,35 ± 0,76*	5,59 ± 0,80*
SC	0,99 ± 0,12*	0,54 ± 0,07*	3,82 ± 0,80*
S/β-IVS-I-6	0,66 ± 0,08 *	0,19 ± 0,09	2,98 ± 0,38*
S/β-IVS-I-5	5,52 ± 0,80*	0,96 ± 0,20*	10,2 ± 1,10*
S/β-Cd39	4,34 ± 1,60*	1,36 ± 0,40*	7,96 ± 1,40*

* $P<0,05$ comparado com o grupo AA. **Grupos:** SS (n=10), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=20).

4.6- Adesão Estático de Plaquetas de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

O ensaio de adesão estático das plaquetas mostrou que as plaquetas de todos grupos de DF estudados: SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) aderiram significativamente mais ao FB do que as plaquetas dos indivíduos controle (P<0,05). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os diferentes grupos de DF (Figura 5).

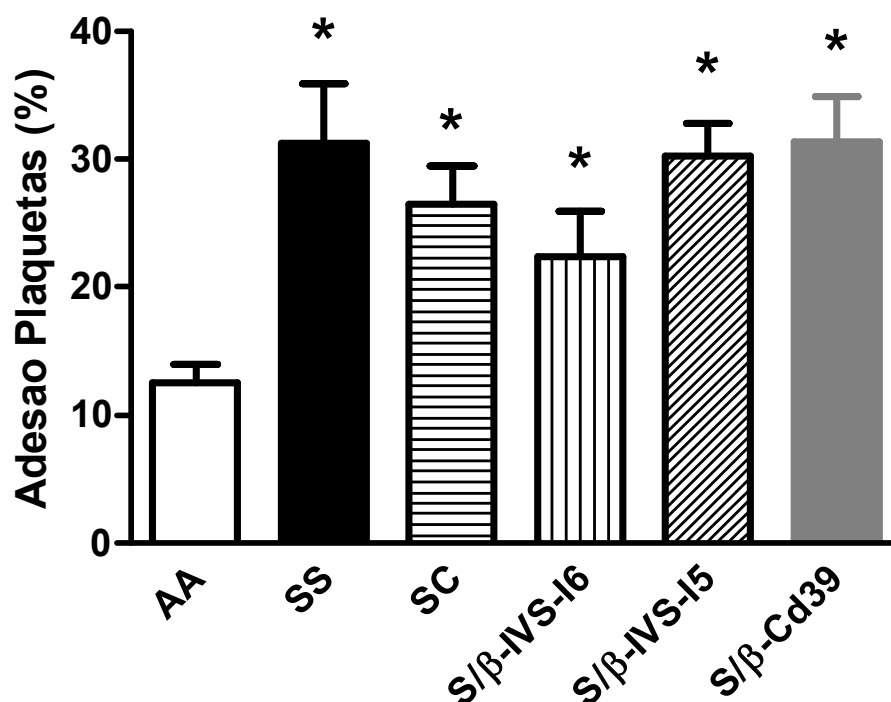


Figura 5: Adesão basal das plaquetas de indivíduos controle (AA) (n=20) e de pacientes SS (10), SC (12), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=14), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=14) e S/β-Códon39 (C→T) (n=8) ao FB (50 µg/ml). Os valores estão representados pela média ± EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS.

4.7- Níveis das Citocinas Inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em Amostras de Plasma de Pacientes com DF e Indivíduos Controle

As dosagens dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foram realizadas em pacientes SS ($n \leq 15$), SC ($n \leq 15$), S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) ($n \leq 15$), S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) ($n \leq 15$), S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) ($n \leq 10$) e indivíduos controle (AA) ($n \leq 15$).

Nossos dados revelaram aumento dos níveis plasmáticos de IL-1 β nos grupos S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), S/ β -Códon39 e SS em relação aos indivíduos controle, e este aumento foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$). Quando comparado o grupo SS com os outros grupos de DF, o grupo SC apresentou uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β ($P < 0,05$) (Figura 6 A).

Em relação aos níveis plasmáticos de IL-6 todos os grupos de DF apresentaram aumento estatisticamente significativo dos níveis desta citocina quando comparado com os indivíduos controle ($P < 0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os diferentes grupos de DF comparado com o grupo SS (Figura 6 B).

Os níveis plasmáticos de IL-8 foram significativamente maiores nos grupos SS e SC em relação aos indivíduos controle ($P < 0,05$). Os grupos S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) apresentaram um menor aumento dos níveis de IL-8 em relação ao grupo SS ($P < 0,05$) (Figura 6 C).

O grupo SS e os 3 grupos de S/ β apresentaram níveis plasmáticos aumentados de TNF- α ($P < 0,05$) em relação aos indivíduos controle. Apenas o grupo SC apresentou um menor aumento dos níveis de TNF- α em comparação ao grupo SS ($P < 0,05$) (Figura 6 D).

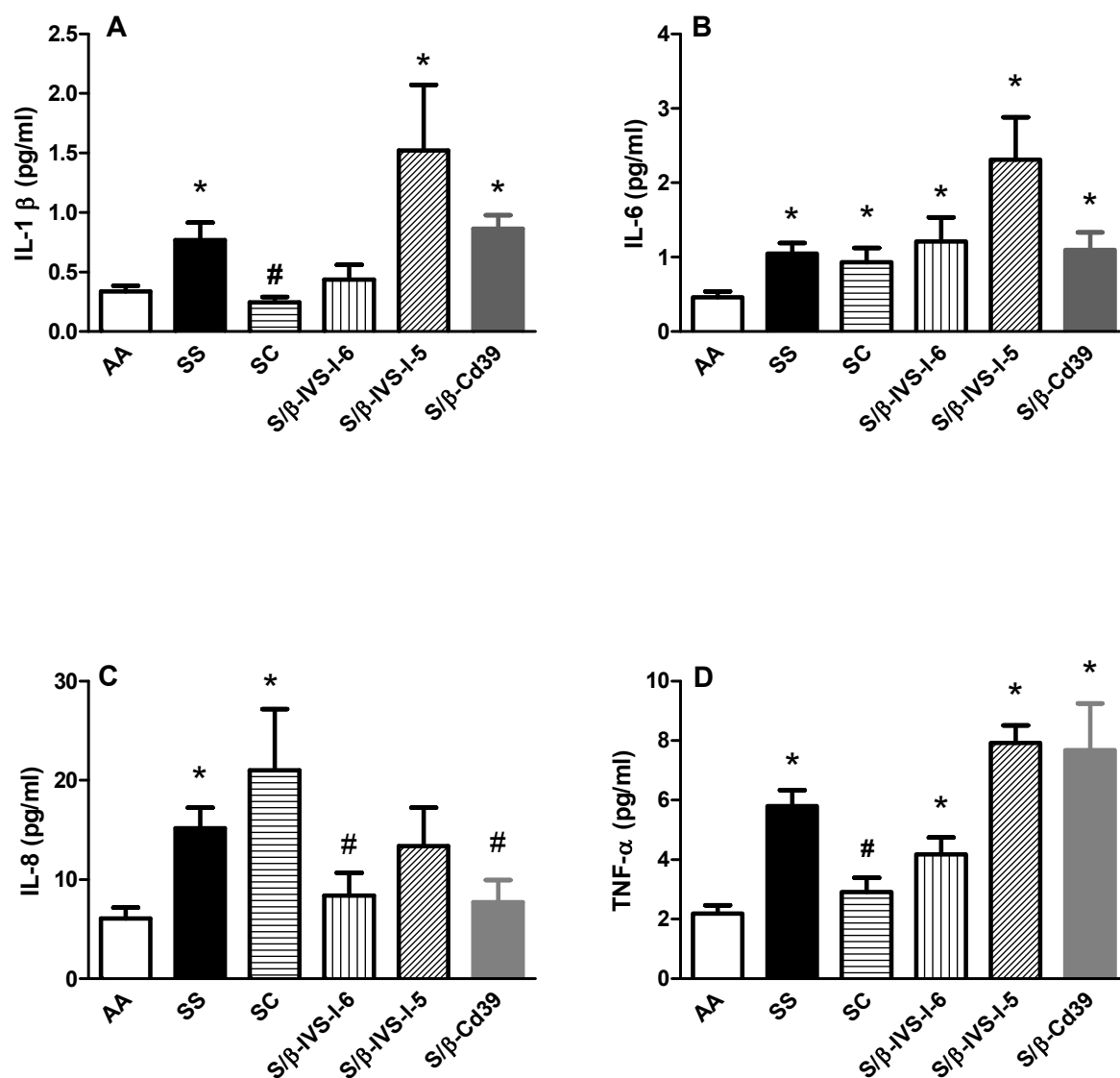


Figura 6: A, B, C e D: Níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em amostras de pacientes com DF: SS, SC, S/β-IVS-I-6 (T→C), S/β-IVS-I-5 (G→C), S/β-Códon39 (C→T) e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS.

4.8- Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na DF e Indivíduos Controle

A produção de ROS dos neutrófilos foi aumentada em todos os grupos de DF quando comparada com os indivíduos controle ($P<0,05$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os diferentes grupos de DF quando comparada com o grupo SS (Figura 7).

Somente os grupos SS e SC apresentaram aumento da produção de ROS em células vermelhas quando comparada com o grupo controle (AA) ($P<0,05$). Os três grupos de S/β apresentaram uma produção de ROS significativamente diminuída em relação ao grupo SS ($P<0,05$) (Figura 8).

Também foi encontrado um aumento significativo da produção de ROS em células mononucleares todos os pacientes com DF quando comparado com o grupo controle (AA) ($P<0,05$). O grupo S/β-IVS-I-6 (T→C) apresentou uma diminuição significativa na produção de ROS em células mononucleares em relação ao grupo SS (Figura 9).

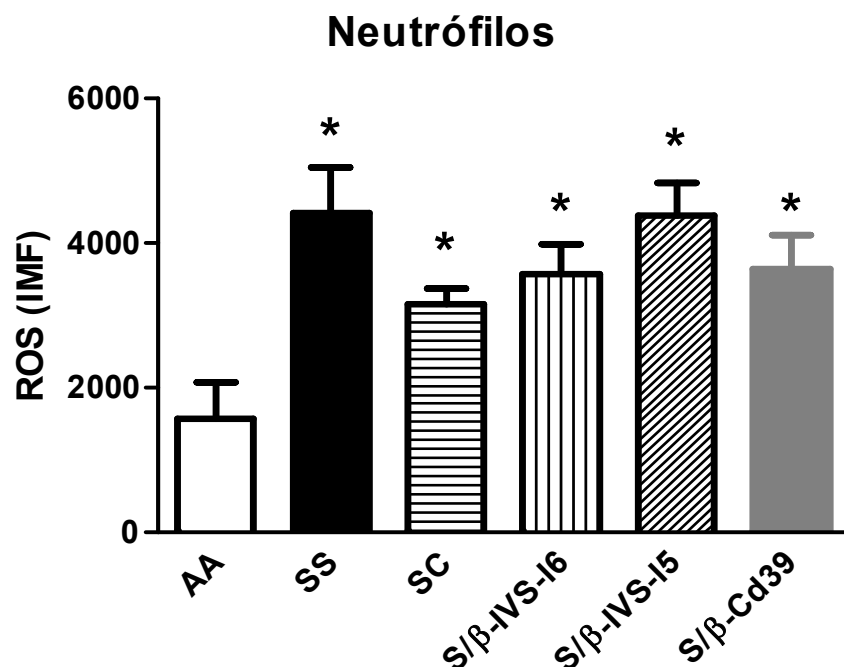


Figura 7: Produção de ROS nos neutrófilos de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). * $P<0,05$ comparado com o grupo AA; # $P<0,05$ comparado com o grupo SS. Grupos: SS (n=12), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=15).

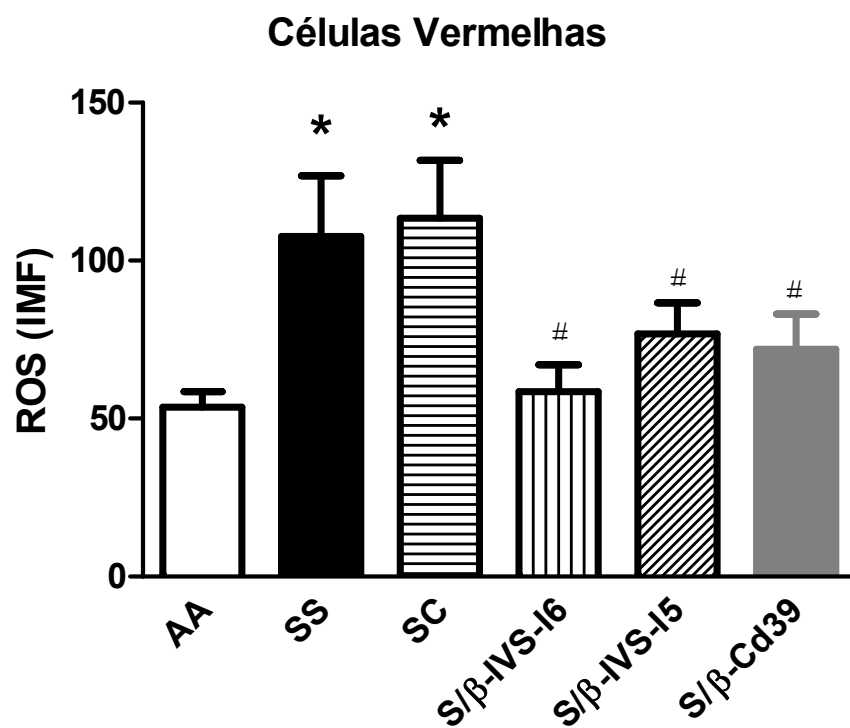


Figura 8: Produção de ROS nas células vermelhas de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA; #P<0,05 comparado com o grupo SS. SS (n=12), SC (n=10), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=15)

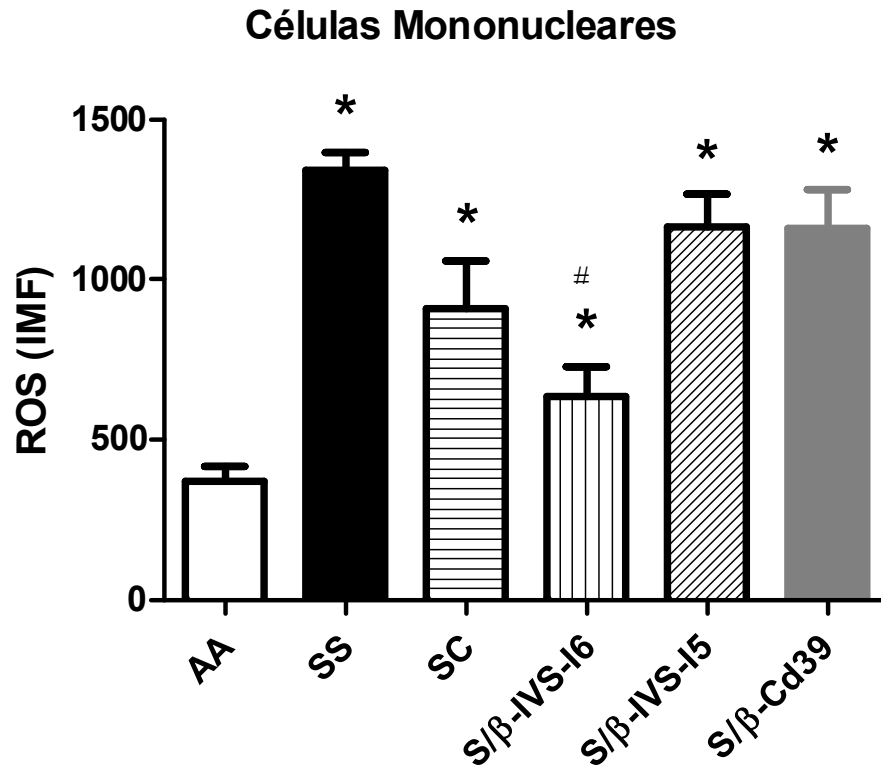


Figura 9: Produção de ROS nas células mononucleares de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). * $P < 0,05$ comparado com o grupo AA; # $P < 0,05$ comparado com o grupo SS. Grupos: SS (n=12), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=15), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=9) e Controle AA (n=15).

4.9- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) na DF e Indivíduos Controle

A atividade plasmática da SOD foi significativamente reduzida nos grupos SC, S/β-Códon39 (C→T) e SS em relação ao grupo controle (AA) ($P<0,05$). Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de DF (Figura 10).

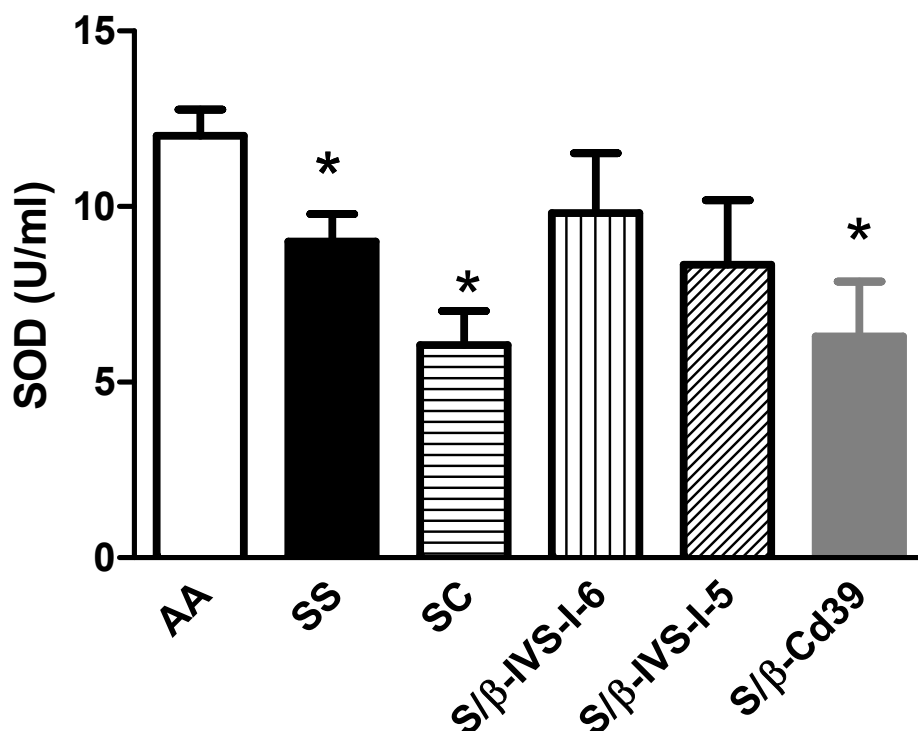


Figura 10: Atividade enzimática de SOD no plasma de pacientes com DF e indivíduos controle (AA). * $P<0,05$ comparado com o grupo AA. SS (n=15), SC (n=14), S/β-IVS-I-6 (T→C) (n=10), S/β-IVS-I-5 (G→C) (n=12), S/β-Códon39 (C→T) (n=10) e Controle AA (n=15).

4.10- Adesão Estática *in vitro* de Neutrófilos, Células Vermelhas e Plaquetas de Pacientes com TI e Indivíduos Controle

Foi verificado que na adesão espontânea dos neutrófilos em placas recobertas com fibronectina (FN), os neutrófilos de pacientes TI mostraram uma adesão significativamente maior à FN (20µg/mL), quando comparados com os neutrófilos de indivíduos controles ($P<0,05$). A adesão dos neutrófilos dos TI foi $13,2 \pm 1,2\%$, comparado com o grupo controle $7,7 \pm 0,7\%$ (Figura 11 A).

Experimentos realizados (Figura 11 B), com o ensaio de adesão estática, para medir os níveis basais de adesão de células vermelhas de indivíduos controles e células vermelhas de pacientes TI, demonstraram as células vermelhas dos TI aderem significativamente mais à FN do que as células normais ($7,24 \pm 0,6\%$ e $3,97 \pm 0,5\%$, respectivamente; $P<0,05$).

O ensaio de adesão estático de plaquetas mostrou que plaquetas de TI aderiram significativamente mais ao FB ($P<0,05$) do que as plaquetas de indivíduos controle ($21,2 \pm 3,3\%$ e $9,5 \pm 1,0\%$, respectivamente) (Figura 11 C).

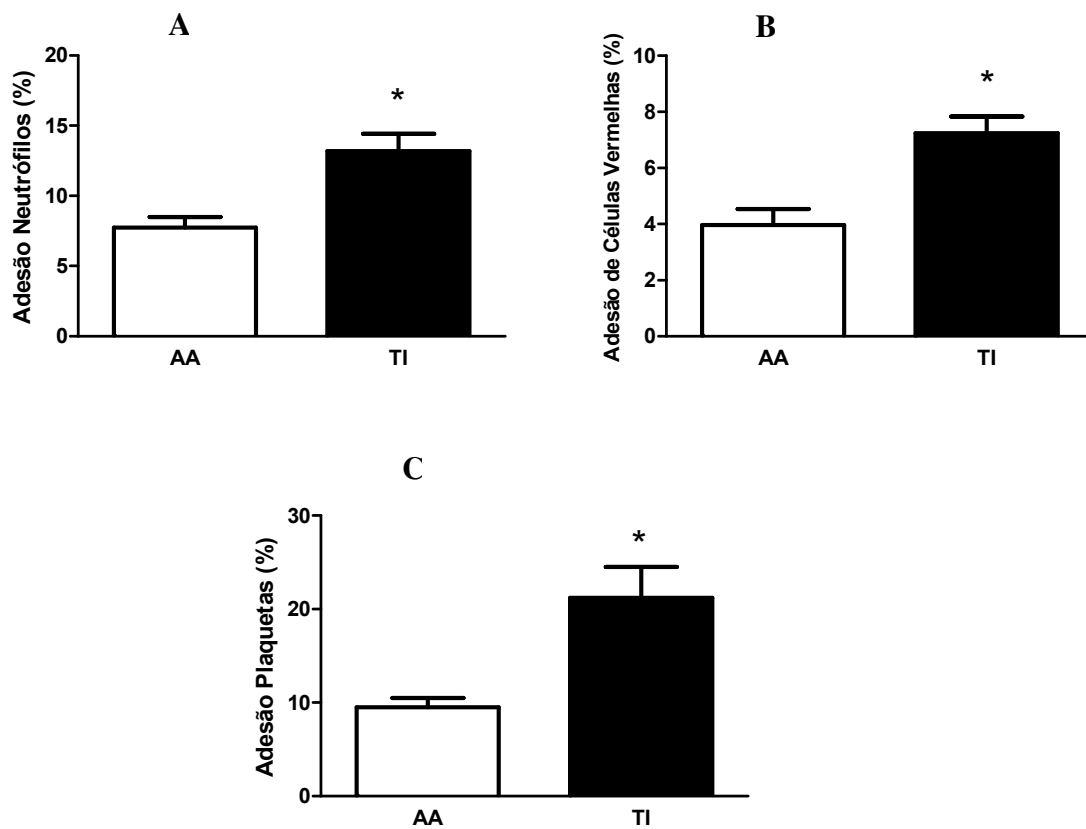


Figura 11: A, B e C: Adesão basal dos neutrófilos (FN), células vermelhas (FN) e plaquetas (FB) isolados de indivíduos controle (AA) ($n \leq 16$) e pacientes TI ($n \leq 16$). Valores representados por média $\pm$ EPM. Os experimentos foram realizados em triplicata. * $P < 0,05$ comparado com o grupo AA.

4.11- Expressão Protéica das Moléculas de Adesão nos Neutrófilos de Pacientes com TI e Indivíduos Controle

A expressão das integrinas VLA-4 (CD49d), Mac-1 (CD11b) e LFA-1 (CD11a) (α -subunidade) na superfície dos neutrófilos de indivíduos controle e pacientes TI foi determinada por citometria de fluxo.

Na tabela 4 estão apresentados, o valor da média e os erros padrões da porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados. Não observamos nenhuma diferença significativa entre o percentual de células positivas das subunidades de integrinas CD11a e CD11b em neutrófilos de pacientes TI em relação aos indivíduos controle. Observamos um aumento significativo do percentual de células positivas CD49d em neutrófilos de TI quando comparado com o grupo AA ($4,9 \pm 0,7\%$ vs $2,3 \pm 0,5\%$; $p=0,013$).

Tabela 4: Expressão de CD11a, CD11b e CD49d na superfície dos neutrófilos de indivíduos controle (AA) (n=15) e pacientes com TI (n=15), determinados por citometria de fluxo. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média do percentual de células positivas.

	CD11a (%)	CD11b (%)	CD49d (%)
TI	$89,10 \pm 3,07$	$91,51 \pm 0,80$	$4,94 \pm 0,74^*$
AA	$91,46 \pm 4,15$	$89,28 \pm 2,44$	$2,31 \pm 0,46$
P	NS	NS	<0,05

* $P < 0,05$ comparado com o grupo AA. NS – Não significativa.

4.12- Capacidade Quimiotática *in vitro* de Neutrófilos de Pacientes com TI e Indivíduos Controle

O ensaio de quimiotaxia *in vitro* para avaliação da capacidade quimiotática dos neutrófilos demonstrou que neutrófilos de pacientes com TI apresentaram uma migração espontânea significativamente maior que neutrófilos de indivíduos controle, na ausência de estímulo quimiotático ($P<0,05$) (Figura 12).

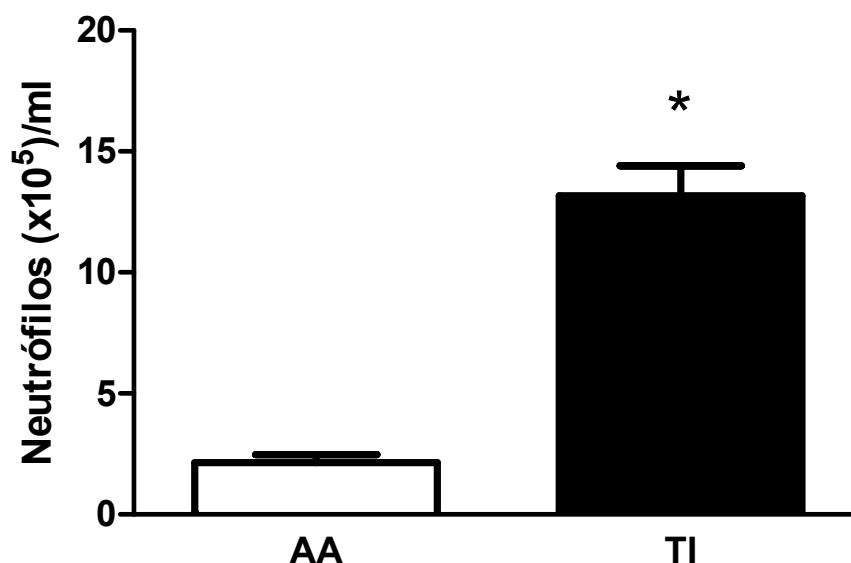


Figura 12: Quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos de indivíduos controle (AA) (n=16) e de pacientes com TI (n=16), para avaliação da migração espontânea. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $P<0,05$ comparado com o grupo AA.

4.13- Expressão Protéica de CD49d, CD36 e CD71 em Células Vermelhas de Pacientes com TI e Indivíduos Controle

A expressão das moléculas de adesão nas células vermelhas, estudada por citometria de fluxo, foi determinada pela porcentagem de células positivas para os receptores.

Na tabela 5 estão apresentados, o valor da média e os erros padrões da porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados. O grupo de TI apresentavam um número significativamente maior de células vermelhas CD36 e CD49d positivas em relação às células vermelhas de indivíduos controles ($P < 0,05$), assim como o percentual de células positivas para o marcador de células vermelhas imaturas CD71.

Tabela 5: Expressão de subunidades de moléculas de adesão na superfície de células vermelhas: CD36, CD49d e CD71 de indivíduos controle (n=15) e pacientes com TI (n=15). Os resultados representam o percentual de células positivas. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

	CD36	CD49d	CD71	p
TI	10,9 $\pm$ 1,83%*	1,44 $\pm$ 0,30%*	14,3 $\pm$ 1,83%*	<0,05
AA	0,63 $\pm$ 0,10%	0,13 $\pm$ 0,02%	1,95 $\pm$ 0,37%	

* $P < 0,05$ comparado com o grupo AA.

4.14- Níveis das Citocinas Inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em Amostras de Pacientes com TI e Indivíduos Controle

As dosagens dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foram realizadas em pacientes TI (n $\leq$ 15) e indivíduos controle (AA) (n $\leq$ 15).

Nossos dados revelaram um aumento significativo (P<0,05) dos níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nos TI em relação ao grupo controle (AA) (Figura 13 A, B, C e D).

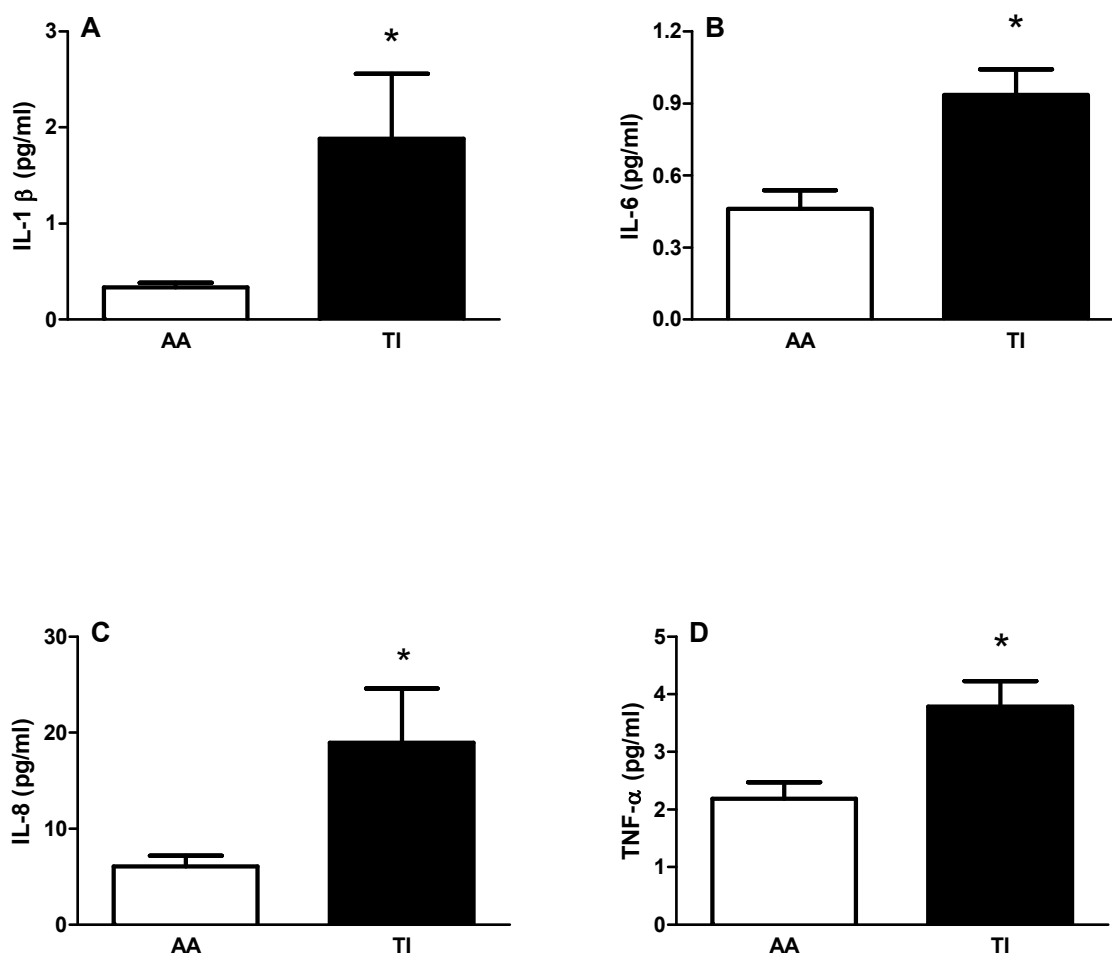


Figura 13: A, B, C e D: Concentração das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em amostras de pacientes TI homozigotos para mutação IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) e indivíduos controle (AA). *P<0,05 comparado com o grupo AA.

4.15- Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) na TI e em Indivíduos Controle

A produção de ROS foi significativamente aumentada nos neutrófilos, nas células vermelhas e mononucleares de pacientes TI quando comparado com o grupo controle AA ($P < 0,05$) (Figura 14 A, B e C).

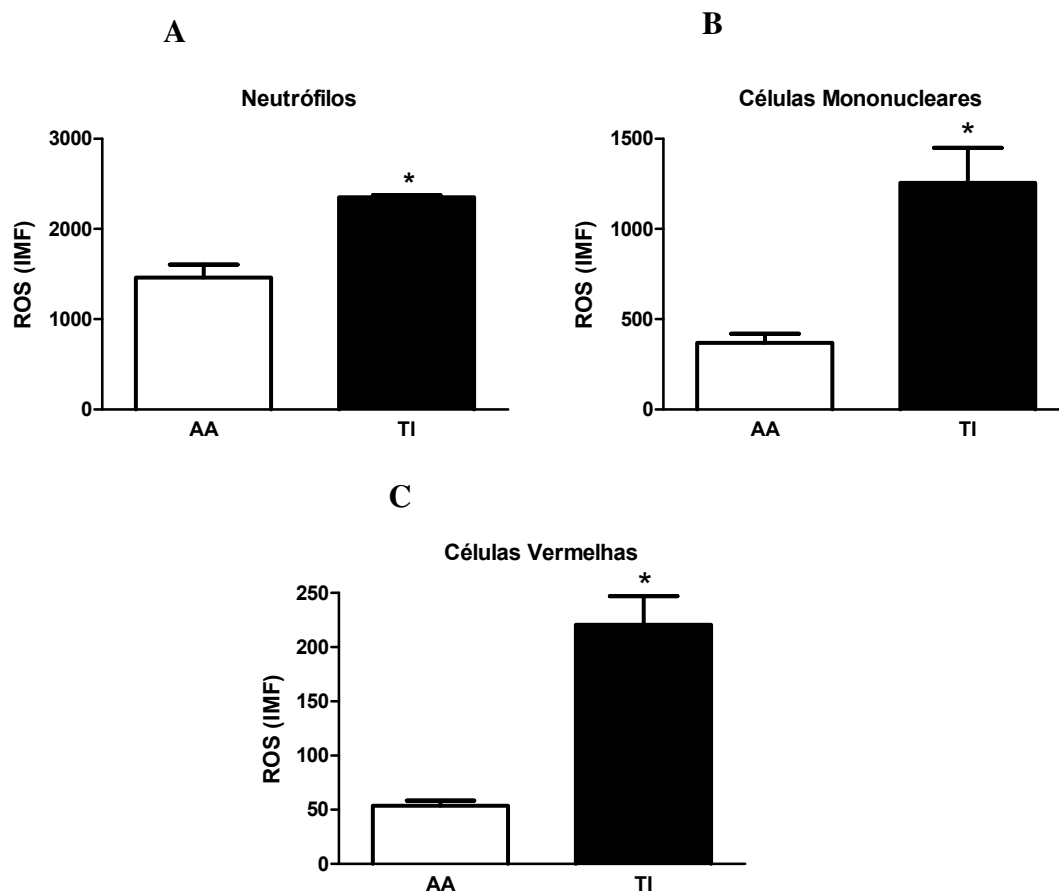


Figura 14: A, B e C: Produção de ROS nos neutrófilos, células vermelhas e plaquetas de pacientes com TI ($n \leq 13$) e indivíduos controle (AA) ($n \leq 15$). * $P < 0,05$ comparado com o grupo AA.

4.16- Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) na TI e em Indivíduos Controle

A atividade plasmática da SOD foi significativamente reduzida em TI quando comparado com os indivíduos controle ($p < 0,05$) (Figura 15).

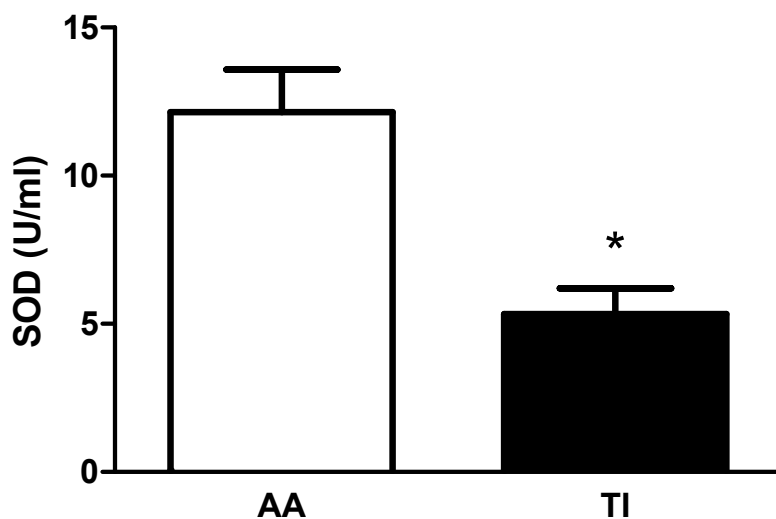


Figura 15: Atividade enzimática de SOD no plasma de pacientes com TI (n=15) e indivíduos controle (AA) (n=15). * $P < 0,05$ comparado com o grupo AA.

Discussão

As manifestações clínicas podem variar entre os principais genótipos da doença falciforme, sendo geralmente mais freqüente e mais grave em homozigotos para HbS (HbSS) e S/ β^0 talassemia e mais branda na hemoglobinopatia SC e S/ β^+ talassemia, exceto para a grande prevalência de retinopatia falciforme proliferativa, e suas conseqüências nos dois últimos que apresentam formas mais brandas (Alexander et al., 2004; Steinberg, 2006).

As doenças falciformes caracterizam-se por manifestações inflamatórias crônicas. De fato, parece que a gênese de grande parte das manifestações clínicas dessas doenças liga-se a três mecanismos inter-relacionados: a) adesão de eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas ao endotélio vascular; b) fenômenos inflamatórios crônicos exarcebados por episódios agudos; c) produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e alterações do metabolismo do NO (Zago e Pinto, 2007). Embora o processo de vaso-oclusão constitua um processo multifatorial e de múltiplos passos, a adesão de eritrócitos ao endotélio vascular é provavelmente o mecanismo primário pelo qual as alterações moleculares que ocorrem na hemácia são transmitidas aos tecidos (Zago e Pinto, 2007; Conran et al., 2009).

A maioria dos estudos sobre as propriedades adesivas de células vermelhas, neutrófilos e plaquetas em ensaios de adesão *in vitro* na DF, foi realizado com pacientes a anemia falciforme (SS) (Gee e Platt, 1995; Kasschau et al., 1996; Fadlon et al., 1998; Canalli et al., 2006; Canalli et al., 2007; Gambero et al., 2006), porém não há relatos na literatura que avaliem essas propriedades em pacientes com a hemoglobinopatia SC e na S/ β talassemia.

Nesse trabalho foram avaliados diferentes grupos de doença falciforme: anemia falciforme (SS), hemoglobinopatia SC (SC) e 3 diferentes genótipos de S/ β talassemia. O primeiro grupo de S/ β foi representado pela mutação IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C), que produz uma talassemia $\beta^{+ \text{ Leve}}$ com níveis relativamente altos de produção de RNA_m normal; citada como a “forma portuguesa” de talassemia β e faz parte da maioria das mutações leves encontradas em talassêmicos do mediterrâneo. O segundo grupo de S/ β foi o da mutação IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C), que resulta em talassemia $\beta^{+ \text{ Grave}}$ com marcante redução da quantidade de RNA_m normal; é tida como a mutação de maior prevalência no sub-contidente indiano. E o terceiro grupo de S/ β foi o da mutação β^0 Códon 39 (C $\rightarrow$ T), com total ausência da síntese

de cadeia β normal, sendo essa mutação a segunda mais comum na população do Mediterrâneo, e a mais freqüente na população Sul e Sudeste do Brasil, de origem predominantemente italiana (Forget, 2001; Araújo et al., 2003; Zago, 2004).

Nossos dados mostram que somente as células vermelhas dos grupos SS e SC tiveram adesão significativamente aumentada à FN do que as células de indivíduos controle. Esses resultados são similares a trabalhos da literatura para pacientes com anemia falciforme (Kasschau et al., 1996; Gambero et al., 2006). Por outro lado, os três diferentes genótipos de S/ β talassemia apresentaram uma diminuição significativa da adesão das células vermelhas em relação ao grupo SS. Sabe-se que as células vermelhas falciformes, diferentemente das células vermelhas normais, aderem avidamente a componentes da parede vascular. Acredita-se que é essa adesão anormal que contribui para as crises vaso-oclusivas que ocorrem em pacientes com AF (Hines et al., 2003).

As moléculas de adesão na superfície externa da membrana celular são mais expressas em eritrócitos falciformes do que em eritrócitos normais, favorecendo, dessa forma, a interação com o endotélio vascular e leucócitos, contribuindo com o processo de vaso-oclusão (Telen, 2000). As moléculas de adesão CD36 e CD49d são expressas somente em reticulócitos (células jovens, mais aderentes e que estão em maior número nesses pacientes) desempenhando um papel importante no fenômeno vaso-oclusivo. (Hebbel, 1997; Telen, 2000). Nossos dados mostraram que os grupos de DF avaliados apresentaram maior expressão protéica dos receptores CD36 e CD49d em células vermelhas quando comparados ao grupo de indivíduos controle (exceto para o grupo S/IVS-I-6 com o marcador CD49d). No entanto, estes resultados não se correlacionaram com o ensaio de adesão estática de células vermelhas para os grupos S/ β , sugerindo, portanto que outras moléculas de adesão poderiam participar desse processo. O aumento da expressão das moléculas de adesão CD36 e CD49d não se deve a reticulocitose observada nesses pacientes, uma vez que os resultados obtidos por Gambero et al. (2006) utilizando amostras de pacientes portadores de esferocitose hereditária, como grupo controle de reticulocitose, não demonstraram diferença significativa na expressão de CD36 e CD49d em relação ao grupo controle AA.

Existem muitas evidências sobre a participação dos leucócitos na fisiopatologia da DF. Os neutrófilos na DF parecem estar ativados na circulação e apresentam alterações

funcionais significantes, como, por exemplo, processo de apoptose (Conran et al., 2007), expressão de moléculas de adesão (Lum et al., 2004; Assis et al., 2005) e adesividade para proteínas da matriz extracelular, células endoteliais de layers e proteínas endoteliais (Kasschau et al., 1996; Fadlon et al., 1998). Nossos resultados mostraram que a adesão dos neutrófilos à fibronectina é maior em todos os grupo de DF avaliados (SS, SC, S/β-IVS-I-6, S/β-IVS-I-5, S/β-Códon39). Esses dados dão suporte as evidências de que alterações funcionais dos neutrófilos tem papel importante na fisiopatologia das DF.

Além disso, os 2 grupos de S/β⁺ (IVS-I-6 (T→C) e S/β-IVS-I-5 (G→C)) mostraram uma diminuição significativa na adesão de neutrófilos à FN quando comparados com o grupo SS. Nossos dados sugerem que a menor adesão dos neutrófilos nestes grupos de DF correlaciona-se com altos níveis de HbA, como ocorre com o grupo S/IVS-I-6 (T→C).

Neutrófilos ativados expressam várias moléculas de adesão, que favorecem a adesão ao endotélio, recrutam plaquetas e outros neutrófilos para o sítio de inflamação, além de secretarem H₂O₂ que lesa o endotélio (Okpala, 2004). Estudos recentes sugerem que os neutrófilos são as células inicializadoras do processo de vaso-oclusão (Chiang et al., 2007), portanto a adesão de leucócitos tem um papel chave na vaso-oclusão, e deste modo oferece um alvo terapêutico atrativo para essa doença. Essa hipótese é consistente com vários estudos clínicos, nos quais a contagem de leucócitos elevada correlaciona-se com mortalidade; síndrome torácica aguda e AVC (Platt et al., 1994; Castro et al., 1994; Ohene-Frempong et al., 1998).

Neste trabalho, nenhuma evidência sugestiva foi encontrada de que as subunidades das integrinas LFA-1 (CD11a) e Mac-1 (CD11b) são expressas em níveis significantemente diferentes nas superfícies dos neutrófilos de pacientes dos diferentes grupos de DF quando comparados com os indivíduos controle. Dados da literatura referente a alterações na expressão de integrinas nos neutrófilos de pacientes com AF são contraditórios (Fadlon et al., 1998; Lard et al., 1999; Okpala et al., 2002). Alguns trabalhos têm relatado aumento na expressão de CD11b/CD18 de neutrófilos não estimulados, em contraste, que nenhuma diferença significativa na expressão de LFA-1 (CD11a/CD18) (Lum et al., 2004); ao passo que outros têm detectado significante aumento de Mac-1 somente após da estimulação celular (Assis et al., 2005). As integrinas são conhecidas por mediar alterações nas

propriedades adesivas. Essas alterações são causadas por mobilização dessas moléculas de adesão na superfície celular, pela mudança de afinidade e avidéz da integrina (Canalli et al., 2008). Desse modo, é possível que o aumento da adesão dos neutrófilos observada nos grupos de DF deve-se a alteração na afinidade das integrinas, e não pela expressão na superfície celular. Em relação a molécula de adesão CD49d, nenhuma alteração significativa foi encontrada nos neutrófilos dos grupos com DF quando comparados com o grupo controle. Esses resultados são similares aos encontrados por Canalli et al. (2008) em pacientes com anemia falciforme. Embora o envolvimento dessa integrina $\beta 1$ tem sido implicado no recrutamento de neutrófilos durante processos inflamatórios crônicos (Burns et al., 2001; Issekutz e Nakazato, 2003), nas DF esta integrina parece não ter participação importante. Apesar de muitos estudos que investigam as propriedades adesivas dos neutrófilos, são raros os trabalhos que avaliam a capacidade quimiotática dos neutrófilos na DF (Lachant e Oseas, 1987; Canalli 2007). No presente estudo, somente os neutrófilos de pacientes dos grupos SS e SC apresentaram uma migração espontânea significativamente maior que os neutrófilos de indivíduos controle, na ausência de estímulo quimiotático. Os neutrófilos dos três grupos de pacientes S/ β não apresentaram uma capacidade quimiotática aumentada em relação ao grupo controle. Além disso, os neutrófilos do grupo S/ β^{+Leve} IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) apresentou uma capacidade quimiotática menor que a dos indivíduos controle e estatisticamente menor que a do grupo SS. Alguns trabalhos têm revelado uma capacidade quimiotática normal dos neutrófilos de pacientes com AF fora de crise, entretanto pacientes com crise vaso-oclusiva apresentaram uma capacidade quimiotática dos neutrófilos significativamente diminuída (Lachant e Oseas, 1987). Os nossos resultados nos grupos SS e SC foram similares aos encontrados por Canalli et al.(2007), onde neutrófilos de pacientes com AF apresentaram uma migração espontânea dos neutrófilos maior que a de neutrófilos do grupo controle, na ausência de estímulo quimiotático, e também na presença de estímulo quimiotático com IL-8. Deste modo, as características migratórias aumentadas podem ter participação no processo vaso-oclusivo, bem como em outras manifestações da doença, tais como, a hipertensão pulmonar e úlceras de perna, onde o recrutamento e migração de neutrófilos podem ter um papel importante (Stenmark et al., 2005; Serjeant et al., 2005).

Existem evidências da ativação da coagulação e plaquetas na DF. Amostras de plasmas obtidas de pacientes com AF fora da crise de dor tem altos níveis de formação ou síntese de trombina, depleção de proteínas anticoagulantes e ativação anormal do sistema fibrinolítico (Ataga e Orringer, 2003; Ataga et al., 2007). No presente trabalho, as plaquetas de todos os grupos de DF aderiram significativamente mais ao fibrinogênio do que as plaquetas de indivíduos controle. Resultados similares foram encontrados por Canalli et al. (2005) e por Ferreira et al. (2008) em pacientes com AF.

O estado inflamatório crônico que ocorre nos pacientes com DF é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente (Zago e Pinto, 2007). Os mecanismos de indução da produção de mediadores inflamatórios por células inflamatórias e consequentemente o efeito dessas moléculas na resposta inflamatória são pouco compreendidos na DF (Lanaro et al., 2009).

Estudos prévios mostram que os eritrócitos falciformes podem ligar-se às células endoteliais via integrina $\alpha_4\beta_1$ (proteína presente na membrana endotelial, receptor da fibronectina quanto da VCAM-1). Por sua vez, a expressão de VCAM-1 no endotélio é regulada por citocinas inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 liberadas pelos leucócitos ativados (Steinberg e Rodgers, 2001; Pathare et al., 2003). O aumento de fibronectina plasmática observado durante respostas inflamatórias pode ser estimulado por citocinas, tais como a IL-6 (Hagiwara et al., 1990). Com isso, o papel das citocinas nos processos vaso-oclusivos tem sido alvo de vários estudos, uma vez que estas constituem importante via de ativação das células endoteliais facilitando a adesão de leucócitos, hemácias e possivelmente plaquetas (Croizat, 1994; Graido-Gonzales et al., 1998; Makis et al., 2000; Pathare et al., 2004; Lanaro et al., 2009).

No presente estudo foram observados níveis elevados de IL-1 β nos grupos SS, S/ β -IVS-I-5 (G $\rightarrow$ C) e S/ β -Cd 39 (C $\rightarrow$ T) em relação aos indivíduos controle ($P < 0,05$). No grupo da hemoglobinopatia SC foi observado uma diminuição significativa dos níveis de desta citocina em relação ao grupo SS. Diferentemente do que foi encontrado em outros estudos, onde não foi observado elevação dessa citocina (Croizat, 1994; Kassachau et al., 1996; Walter et al., 2006). Entretanto alguns autores encontraram elevação dessa citocina em pacientes com AF fora de crise (Phatare et al., 2004).

Em todos os grupos de DF deste trabalho foram observados um aumento significativo dos níveis de IL-6 em relação ao grupo de indivíduos controle. Estes dados confirmam resultados anteriores descritos na literatura, que de maneira geral observaram aumento dessa citocina em pacientes com AF (Kasschau et al., 1996; Pathare et al., 2004; Walter et al., 2006; Ataga et al., 2008). Os níveis de IL-6 foram significativamente mais elevados em pacientes com DF e hipertensão pulmonar quando comparado com o grupo de DF sem hipertensão pulmonar (Ataga et al., 2008). Essa citocina, juntamente com a TNF- α , é liberada na área com oclusão vascular e estimula a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (Pathare et al., 2004). Alguns trabalhos sugerem que os níveis aumentados de IL-6 e TNF- α correlacionam-se positivamente com aderência de neutrófilos falciformes à fibronectina (Kasschau et al., 1996).

Nossos dados demonstram um aumento significativo dos níveis circulantes de IL-8 nos grupos SS e SC em relação aos indivíduos controle. Por outro lado, os grupos S/ β -IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) e S/ β -Códon39 (C $\rightarrow$ T) apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de IL-8 em relação ao grupo SS.

Estudos prévios demonstraram níveis elevados de IL-8 circulante apenas em pacientes quando estão em crise vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda e hipertensão pulmonar (Duits et al., 1998; Goncalves et al., 2001; Abboud et al., 2000; Pathare et al., 2004; Itaga et al., 2008), entretanto, assim como nesse estudo, há relatos de níveis elevados dessa citocina em pacientes com DF fora de crise (Lanaro et al., 2009). A IL-8 uma mediadora chave na inflamação aguda mediada por neutrófilos, com um papel crucial em um número de doenças inflamatórias e patologias pulmonares (Mukaida et al., 2003), assim como na ativação da quimiotaxia dos neutrófilos (Baggiolini et al., 1994). A produção de IL-8 pode ser induzida por citocinas pro-inflamatórias, tais como, TNF- α e IL-1 (Makis et al., 2000). Os dados deste estudo revelaram que o grupo SS e os 3 grupos de S/ β apresentaram níveis plasmáticos significativamente aumentados de TNF- α em relação aos indivíduos controle. Estudos prévios têm demonstrado aumento dos níveis circulantes de TNF- α em indivíduos com DF fora de crise (Tavakkoli et al., 2004) e durante eventos de crise (Pathare et al., 2004). O TNF- α é capaz de ativar leucócitos, aumentar a aderência de neutrófilos e monócitos à matriz celular, estimular a proliferação de fibroblastos e a

produção de algumas citocinas (Thommesen et al., 1998). O grupo SC apresentou uma diminuição significativa dos níveis de TNF- α em comparação ao grupo SS.

Pacientes com DF são propensos ao aumento do stress oxidativo, particularmente durante as crises vaso-oclusivas e síndrome torácica aguda (Klings e Farber, 2001). Acredita-se que aspectos da fisiopatologia da DF são resultantes de *stress* oxidativo de células vermelhas, leucócitos e células endoteliais (Repka e Hebbel, 1991; Klings e Farber, 2001).

A produção de ROS dos neutrófilos e células mononucleares foi significativamente aumentada em todos os grupos de DF quando comparada com os indivíduos controle. Somente foram observados aumento da produção de ROS em células vermelhas nos grupos SS e SC em relação aos indivíduos controle. Estudos realizados em pacientes com DF encontraram uma produção de ROS em neutrófilos, células vermelhas e plaquetas 30 vezes maior que a do grupo controle (Amer et al., 2005). O *stress* oxidativo tem participação importante no processo vaso-oclusivo da DF e está relacionado com a aderência anormal das células vermelhas, leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular, em áreas nas quais desenvolveu isquemia/reperfusão (Wood e Granger, 2007). Essa hipótese se deve ao fato de que alguns relatos indicam que quantidades aumentadas de moléculas oxidantes, tais como ROS, são produzidas durante períodos de reperfusão (Dhalla et al., 2000; Klings e Farber et al., 2001) e quando polimorfonucleares tornam-se ativados ou aderem ao endotélio (Mohamed et al., 1993). Além disso, a produção de superóxido pode promover a adesão de células vermelhas, sugerindo que um fenótipo pró-adesivo das hemácias falciformes pode estar relacionado com o *stress* oxidativo (Sultana et al., 1998).

A produção de ROS é controlada, sob condições fisiológicas normais, pela presença de enzimas antioxidantes e sequestradores de radicais de oxigênio, que previnem danos ao organismo. Uma excessiva produção de ROS pode ser prejudicial, superando a capacidade antioxidante e conduzindo a um desequilíbrio redox. Vários estudos relatam uma diminuição do mecanismo anti-oxidante na DF (Amer et al., 2006; Schacter et al., 1988).

Nesse trabalho foi observado uma redução significativa da atividade plasmática da SOD nos grupos SS, SC e S/ β -Códon39 em relação aos indivíduos controle. Assim como relatado em estudos prévios, os mecanismos de defesa antioxidante estão afetados na DF,

onde são encontrados níveis/atividades diminuídos de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Nossos resultados da SOD foram similares aos encontrados por Schacter et al. (1988), que demonstraram uma redução na atividade da SOD nas células vermelhas e no soro de pacientes com DF.

Além da DF outra forma comum de anemia hemolítica hereditária é a síndrome β talassêmica. Uma forma de talassemia β é clinicamente definida como intermediária, quando se revela como uma anemia crônica moderada, sem necessidade transfusional contínua (Weatherall e Clegg, 2001). Muitas manifestações clínicas têm sido descritas em pacientes talassêmicos, incluindo infecção, sobrecarga de ferro, função endócrina anormal, pericardite, hematopoese extramedular, hipertensão pulmonar e úlceras de perna. Essas anormalidades indicam que o defeito nas células vermelhas contribui para anormalidades em muitos órgãos. As úlceras de perna e trombose de artéria pulmonar sugerem a possibilidade de envolvimento vascular em pacientes talassêmicos (Buntthep et al., 2002; Weatherall e Clegg, 2001; Taher et al., 2006). Estudos *in vitro* indicam que as células vermelhas de pacientes com talassemia têm uma maior aderência a células endoteliais em cultura, sugerindo distúrbios do endotélio vascular nesses pacientes (Buntthep et al., 1992).

Poucos são os estudos que avaliaram as propriedades adesivas das células na talassemia β . Nossos resultados mostram que a adesão dos neutrófilos, células vermelhas e plaquetas de pacientes TI foi significativamente maior comparado com os indivíduos controle.

Em relação às células vermelhas, Hovat et al. (1999) encontraram uma maior aderência de células vermelhas de pacientes com talassemia maior e intermediária a células endoteliais em relação às células vermelhas de indivíduos normais. No grupo de pacientes com TI o aumento da adesão das células vermelhas a fibronectina foi correlacionado positivamente com o aumento da expressão das moléculas de adesão CD36 e CD49d nessas células. Esses dados indicam que as moléculas de adesão CD36 e CD49d tem papel importante na adesão de células vermelhas ao endotélio vascular na TI.

Foi observado um aumento significativo da expressão da molécula de adesão CD49d em neutrófilos, no entanto não houve diferença estatística no percentual das integrinas CD11a e CD11b em neutrófilos. Esses dados indicam que a moléculas de adesão CD49d tem papel importante na adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular na TI. Além

da adesão, foi avaliada a capacidade quimiotática dos neutrófilos de pacientes com TI, nossos resultados mostraram a que a capacidade quimiotática dos neutrófilos dos pacientes TI foi significativamente maior que no grupo controle. Trabalhos citados na literatura que avaliaram a capacidade quimiotática dos neutrófilos em pacientes com talassemia β maior encontraram uma diminuição da capacidade quimiotática (Palácios et al., 1993; Matzner et al., 1993; Kutukculer et al., 1996). É importante ressaltar que os pacientes analisados no nosso estudo eram talassêmicos intermediários não dependentes de transfusão.

Vários defeitos imunológicos são observados em pacientes talassêmicos como, por exemplo, aumento da síntese de imunoglobulinas policlonais, defeito na via alternativa do complemento e alterações numéricas e funcionais de sub-populações de linfócitos. Além disso, trabalhos demonstraram que citocinas, mediadores importantes das diferentes fases da resposta imune, podem ter importância biológica e clínica em pacientes com talassemia (Meliconi et al., 1992; Uguccioni et al., 1993). Portanto, alterações na produção de citocinas e/ou mediadores inflamatórios pode ter um impacto relevante nas manifestações clínicas desses indivíduos. Nossos dados revelaram um aumento significativo dos níveis plasmáticos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nos TI em relação ao grupo controle.

Vários trabalhos demonstraram um aumento nos níveis de IL-8 e TNF- α em pacientes talassêmicos e sugerem que este aumento está relacionado com a ativação dos macrófagos em consequência da sobrecarga de ferro e estimulação antigênica relacionada a terapia de transfusão crônica (Dore et al., 1995). No entanto, no presente trabalho observamos um aumento significativo dessas citocinas em pacientes talassêmicos sem terapia de transfusão crônica, descartando a hipótese de que esse aumento é uma consequência da estimulação antigênica. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Dore et al (1995), onde os níveis séricos da IL-8 estão aumentados em pacientes com TI sem regime de transfusão. Os autores sugerem que na TI o macrófago está ativado devido à hemólise crônica. Por outro lado, estudo realizado por Walter et al., (2006) em pacientes com talassemia β não observaram aumento de nenhuma dessas citocinas, no entanto, este trabalho avaliou pacientes regularmente transfundidos. Em pacientes com talassemia β maior níveis aumentados das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram relacionados com o aumento VCAM-1 e ICAM-1 solúveis (Kyriakou et al., 2001; Aggeli et al., 2005). No nosso estudo, encontramos maior concentração dessas citocinas no plasma de TI; e isso

pode ter uma relação direta com as propriedades adesivas aumentadas das células vermelhas e neutrófilos nesses indivíduos.

Nas talassemias, há sobrecarga de ferro pelo aumento da absorção deste elemento da dieta, associado à necessidade de transfusões sanguíneas frequentes. O excesso desse metal se deposita em diversos órgãos, como fígado, baço, coração e pâncreas, levando a falência múltiplos órgãos. Assim, a quelatação do ferro é fundamental para o tratamento das talassemias. Sobrecarga de ferro também foi descrita na própria hemácia talassêmica, provavelmente por exposição dos grupamentos heme devido à instabilidade da molécula de hemoglobina na presença do desequilíbrio da produção de cadeias α e β (Rachmilewitz et al., 2005; Amer et al., 2004).

O aumento da suscetibilidade para o *stress* oxidativo é um dos principais fatores envolvido na hemólise das células vermelhas em talassêmicos. A auto-oxidação das cadeias globínicas, sobrecarga de ferro e baixos níveis de HbA aumentam o *stress* oxidativo (Shinar et al., 1990; Vives Corrons et al., 1995). Sabe-se que o ferro está envolvido na geração de ROS (Amer et al., 2004). Adicionalmente estudos demonstram uma diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante nesta doença (Dhawan et al., 2005; Amer et al., 2006).

A produção de ROS foi significativamente aumentada nas hemácias, neutrófilos e mononucleares de pacientes TI quando comparado com o grupo controle. Adicionalmente a atividade plasmática da SOD foi significativamente reduzida em TI. Em alguns estudos foram observados que células vermelhas e polimorfonucleares de pacientes com talassemia β apresentavam aumento da produção de ROS comparado com células vermelhas normais, assim como uma diminuição do mecanismo antioxidante pela glutatona (Amer et al., 2003; Amer et al., 2004; Amer e Fibach, 2005). Outros trabalhos também relatam uma diminuição na atividade antioxidante da superóxido dismutase em pacientes com talassemia β maior (Dhawan et al., 2005; Pavlova et al., 2007).

Conclusões

- Este é o primeiro estudo que avalia as propriedades adesivas e quimiotáticas, bem como *stress* oxidativo em neutrófilos, células vermelhas e mononucleares, na hemoglobinopatia SC;
- Apesar da doença SC possuir uma clínica mais branda, nossos dados sugerem que neutrófilos, glóbulos vermelhos e plaquetas de pacientes com HbSC possuem características adesivas e quimiotáticas semelhantes às encontradas nas células de pacientes com HbSS;
- Considerando a diferença no grau de hemólise entre pacientes SS e SC, podemos sugerir que a hemólise não é o único fator determinante no aumento das propriedades adesivas e quimiotáticas;
- Considerando a diferença nos níveis médios de HbA entre os grupos S/ β ^{+grave-IVS-I-5} e S/ β ^{+leve-IVS-I-6}, nossos dados sugerem que, quanto maiores os níveis de HbA, menor a adesão de neutrófilos, glóbulos vermelhos e plaquetas na S/ β talassemia, podendo explicar as diferenças clínicas encontradas nesses pacientes em função do genótipo;
- Trata-se da primeira avaliação completa das propriedades adesivas e quimiotáticas de neutrófilos, células vermelhas e plaquetas, em pacientes com TI sem transfusão;
- O aumento global nos níveis das citocinas sugere que, na TI, há um processo inflamatório crônico que pode estar envolvido no aumento da adesão e quimiotaxia celular;
- Podemos admitir a possibilidade de que a sobrecarga de ferro que pacientes com TI apresentam esteja contribuindo para o aumento da produção de ROS e, portanto, para o aumento das propriedades adesivas e quimiotáticas das células;
- É possível que o aumento da aderência, da capacidade quimiotática, da produção de ROS, das citocinas e diminuição do mecanismo antioxidante, observados neste estudo, contribuam nas complicações clínicas encontradas na β -TI, tais como hipertensão pulmonar e úlceras de perna.

Referências Bibliográficas

Abboud MR, Taylor EC, Habib D, Dantzler-Johnson T, Jackson SM, Xu F, Laver J, Ballas SK. Elevated serum and bronchoalveolar lavage fluid levels of interleukin 8 and granulocyte colony-stimulating factor associated with the acute chest syndrome in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol.** 2000;111(2):482-90.

Aggeli C, Antoniadis C, Cosma C, Chrysoshoou C, Tousoulis D, Ladis V, Karageorga M, Pitsavos C, Stefanadis C. Endothelial dysfunction and inflammatory process in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia major. **Int J Cardiol.** 2005;105(1):80-4.

Alexander N, Higgs D, Dover G, Serjeant GR. Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? **Br J Haematol.** 2004;126(4):606-11.

Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. **Eur J Haematol.** 2003;70(2):84-90.

Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. **Cytometry A.** 2004;60(1):73-80.

Amer J, Fibach E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. **Br J Haematol.** 2005;129(3):435-41.

Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **Br J Haematol.** 2006;132(1):108-13.

Araújo AS, Silva WA, Leão SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago MA. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin.** 2003;27(4):211-7.

Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta Haematol.** 2005;113(2):130-6.

Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. **Am J Med.** 2003;115(9):721-8.

Ataga KI, Cappellini MD, Rachmilewitz EA. Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. **Br J Haematol.** 2007;139(1):3-13.

Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise LV, Orringer EP. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. **Haematologica.** 2008;93(1):20-6.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. **Adv Immunol.** 1994;55:97-179.

Bandeira FMGC, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM, Marques M. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobinas S detectados através de triagem de sangue de cordão umbilical. **J. Pediatr.** 1999;75(3):167-171.

Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood.** 2000;96(7):2451-9.

Bellavite P, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C. A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. **Anal Biochem.** 1994;216(2):444-50.

Bezerra MAC. Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em População do Estado de Pernambuco. **Dissertação de Mestrado** Apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas. 2007.

Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol.** 1982;78(3):206-9.

Bunn HF, Forget BG. Molecular Genetics and Biosynthesis of Hemoglobin. In: Bunn HF, Forget BG. **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.** 1st edition. Philadelphia, P.A, USA, Saunders Company. 1986, p. 169-222.

Burns JA, Issekutz TB, Yagita H, Issekutz AC. The alpha 4 beta 1 (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and alpha 5 beta 1 (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate beta 2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. **J Immunol.** 2001;166(7):4644-9.

Butthep P, Bunyaratvej A, Kitaguchi H, Funahara Y, Fucharoen S. Interaction between endothelial cells and thalassemic red cells in vitro. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 1992;23 Suppl 2:101-4.

Butthep P, Rummavas S, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharoen S, Bunyaratvej A. Increased circulating activated endothelial cells, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor in thalassemia. **Am J Hematol**. 2002;70(2):100-6.

Camaschella C, Cappellini MD. Thalassemia intermedia. **Haematologica**. 1995;80(1):58-68

Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Exp Hematol**. 2004;32(8):728-34.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Conran N, Moragante R, Gambero S, Saad ST, Costa FF. Altered Red Cell and Platelet Adhesion in the Hemolytic Diseases: Hereditary Spherocytosis, Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Sickle Anemia. **Blood**. 2006; 108(11):364A.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad ST, Costa FF, Conran N. Role for cAMP-protein kinase A signalling in augmented neutrophil adhesion and chemotaxis in sickle cell disease. **Eur J Haematol**. 2007;79(4):330-7.

Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad ST, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Haematologica**. 2008;93(4):605-9.

Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in beta-thalassemias. **Blood Rev**. 1994;8(1):1-12.

Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC. Molecular diagnosis and carrier screening for beta thalassemia. **JAMA**. 1997;278(15):1273-7.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**. 1994;84(7):2068-101.

- Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, Vera JC, Levy PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood**. 1994;84(2):643-9.
- Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proc Soc Exp Biol Med**. 1999;222(3):274-82.
- Chiang EY, Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am**. 2005;19(5):771-84.
- Chiang EY, Hidalgo A, Chang J, Frenette PS. Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. **Nat Methods**. 2007;4(3):219-22.
- Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone MA Jr, Cremona O, Marchisio PC, Dejana E. Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. **Blood**. 1992;80(2):437-46.
- Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. **Biochem Pharmacol**. 2003 Jul 1;66(1):43-50.
- Conran N, Oresco-Santos C, Acosta HC, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br J Haematol**. 2004;124(4):547-54.
- Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**. 2009;33(1):1-16.
- Costa FF, Tavella MH, Zago MA. Beta-thalassemia intermedia and IVS-1 NT6 homozygosis in Brazil. **Braz J Med Biol Res**. 1991;24(2):157-61.
- Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, Cap. 30, p. 289-308.
- Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol**. 1994;87(3):592-7.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens**. 2000;18(6):655-73.

- De Franceschi L, Corrocher R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica**. 2004;89(3):348-56.
- De Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic Biol Med**. 1999;26(1-2):202-26.
- Dhawan V, Kumar KhR, Marwaha RK, Ganguly NK. Antioxidant status in children with homozygous thalassemia. **Indian Pediatr**. 2005;42(11):1141-5.
- Dore F, Bonfigli S, Pardini S, Longinotti M. Serum interleukin-8 levels in thalassemia intermedia. **Haematologica**. 1995;80(5):431-3.
- Duits AJ, Schnog JB, Lard LR, Saleh AW, Rojer RA. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. **Eur J Haematol**. 1998;61(5):302-5.
- Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, Fishlock K, Brown KA. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. **Blood**. 1998;91:266–274.
- Ferreira RP, Franco-Penteado CF, Saad STO, Costa FF, Conran N. Platelets from sickle cell disease individuals demonstrate increased adhesive properties that are reversed by hydroxyurea therapy in association with alterations in intraplatelet cAMP and alpha-IIb-beta integrin activation. **Blood**. 2008;112. p.859-859.
- Forget BG. Molecular Mechanisms of β Thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RN. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. Cambridge University Press: NY, USA, 2001, Cap.12, p. 252-276.
- Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Curr Opin Hematol**. 2002;9(2):101-6.
- Gambero S, Canalli AA, Traina F, Albuquerque DM, Saad ST, Costa FF, Conran N. Therapy with hydroxyurea is associated with reduced adhesion molecule gene and protein

expression in sickle red cells with a concomitant reduction in adhesive properties. **Eur J Haematol.** 2006 ;78(2):144-51.

Gee BE, Platt OS. Sickle reticulocytes adhere to VCAM-1. **Blood.** 1995;85(1):268-74.

Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, Albuquerque A, Sant'Ana A, dos Reis MG, Barral A, Barral Netto M. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. **Braz J Med Biol Res.** 2001;34(10):1309-13.

Graido-Gonzales E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E₂ levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood.** 1998;92(7):2551-5.

Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. **Blood.** 1992;80(5):1105-15.

Hagiwara T, Suzuki H, Kono I, Kashiwagi H, Akiyama Y, Onozaki K. Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes. **Am J Pathol.** 1990;136(1):39-47.

Hebbel RP, Yamada O, Moldow CF, Jacob HS, White JG, Eaton JW. Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. **J Clin Invest.** 1980;65(1):154-60.

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

Hershko C, Link G, Cabantchik I. Pathophysiology of iron overload. **Ann N Y Acad Sci.** 1998;850:191-201.

Higgs DR. α -Thalassaemia. In: **Baillière's Clinical Haematology.** 1993; 6(1):117-150.

Higgs DR, Wood WG. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008;105(33):11595-6.

- Hines PC, Zen Q, Burney SN, Shea DA, Ataga KI, Orringer EP, Telen MJ, Parise LV. Novel epinephrine and cyclic AMP-mediated activation of BCAM/Lu-dependent sickle (SS) RBC adhesion. **Blood**. 2003;101(8):3281-7.
- Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype? **Br J Haematol**. 1998;100(1):70-8.
- Horie S, Kita H. CD11b/CD18 (Mac-1) is required for degranulation of human eosinophils induced by human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and platelet-activating factor. **J Immunol**. 1994 Jun 1;152(11):5457-67.
- Hovav T, Goldfarb A, Artmann G, Yedgar S, Barshtein G. Enhanced adherence of beta-thalassaemic erythrocytes to endothelial cells. **Br J Haematol**. 1999;106(1):178-81.
- Issekutz AC, Nakazato S, Issekutz TB. Differential roles of VLA-4(CD49d/CD29) and LFA-1(CD11a/CD18) integrins and E- and P-selectin during developing and established active or adoptively transferred adjuvant arthritis in the rat. **Immunol Cell Biol**. 2003;81(5):397-408.
- Joneckis CC, Ackley RL, Orringer EP, Wayner EA, Parise LV. Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood**. 1993;82(12):3548-55.
- Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**. 1996;87(2):771-80.
- Kaul DK, Liu XD, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Hebbel RP. Anti-inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2004;287(1):H293-301.
- Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respir Res**. 2001;2(5):280-5.
- Kutukculer N, Kutlu O, Nisli G, Oztop S, Cetingul N, Caglayan S. Assessment of neutrophil chemotaxis and random migration in children with thalassemia major. **Pediatr Hematol Oncol**. 1996;13(3):239-45.

- Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, Liapi D, Kourelis TV, Passam F, Papadakis A. Activated peripheral blood and endothelial cells in thalassemia patients. **Ann Hematol.** 2001;80(10):577-83.
- Lachant NA, Oseas RS. Vaso-occlusive crisis-associated neutrophil dysfunction in patients with sickle-cell disease. **Am J Med Sci.** 1987;294(4):253-7.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc Biol.** 2009;85(2):235-42.
- Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ. Neutrophil activation in sickle cell disease. **J Leukoc Biol.** 1999;66(3):411-5.
- Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008;105(33):11869-74.
- Lum AF, Wun T, Staunton D, Simon SI. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am J Hematol.** 2004;76(2):126-33.
- Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann Hematol.** 2000;79(8):407-13.
- Matzner Y, Goldfarb A, Abrahamov A, Drexler R, Friedberg A, Rachmilewitz EA. Impaired neutrophil chemotaxis in patients with thalassaemia major. **Br J Haematol.** 1993;85(1):153-8.
- McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. **Curr Opin Hematol.** 2003;10(2):150-8.
- Meliconi R, Uguccioni M, Lalli E, Nesci S, Delfini C, Paradisi O, Lucarelli G, Gasbarrini G, Facchini A. Increased serum concentrations of tumour necrosis factor in beta thalassaemia: effect of bone marrow transplantation. **J Clin Pathol.** 1992;45(1):61-5.

Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, Wethers DL, Smith J, Kinney TR. Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. **N Engl J Med**. 2000;342(2):83-9.

Mohamed AO, Hashim MS, Nilsson UR, Venge P. Increased in vivo activation of neutrophils and complement in sickle cell disease. **Am J Trop Med Hyg**. 1993;49(6):799-803.

Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2003;284(4):L566-77.

Nagel RD, Platt OS. General Pathophysiology of Sickle Cell Anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. **Disorders of Hemoglobin - Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. Cambridge University Press: Ed. USA, 2001; cap. 20; p.494-526.

Natta CL, Chen LC, Chow CK. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. **Acta Haematol**. 1990;83(3):130-2.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**. 1998;91(1):288-94.

Olivieri NF. The beta-thalassemias. **N Engl J Med**. 1999;341(2):99-109.

Okpala I, Daniel Y, Haynes R, Odoemene D, Goldman J. Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. **Eur J Haematol**. 2002;69(3):135-44.

Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. **Blood Rev**. 2004;18(1):65-73.

Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**. 2006;13(1):40-4.

Okumura N, Tsuji K, Nakahata T. Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors. **Blood**. 1992;80(3):642-50.

Owens MA, Loken MR. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. New York – EUA. Ed. Wiley Liss. 224p, 1995.

Palacios MF, Testoni RA, Ballart IJ, de Miani SA, Díez RA, Estevez ME, Sen L. Neutrophil chemotactic dysfunction in multitransfused thalassemia patients. **Sangre**. 1993;38(4):295-9.

Pathare A, Kindi SA, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. **Hematology**. 2003;8(5):329-37.

Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am J Hematol**. 2004;77(4):323-8.

Pavlova LE, Savov VM, Petkov HG, Charova IP. Oxidative stress in patients with beta-thalassemia major. **Prilozi**. 2007;28(1):145-54.

Petri B, Bixel MG. Molecular events during leukocyte diapedesis. **FEBS J**. 2006;273(19):4399-407.

Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med**. 1994;330(23):1639-44.

Powars DR. Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol Oncol Clin North Am**. 1991;5(3):475-93.

Rachmilewitz EA, Weizer-Stern O, Adamsky K, Amariglio N, Rechavi G, Breda L, Rivella S, Cabantchik ZI. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? **Ann N Y Acad Sci**. 2005;1054:118-23.

Ramvalho AS, Teixeira RC, Teixeira PA. Genética e saúde pública no Brasil: Os programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias. **Ann. Acad. Nac. Med**. 1996;156(1):13-18.

Repka T, Hebbel RP. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. **Blood**. 1991;78(10):2753-8.

Roseblatt M, Vuillet-Gaugler MH, Leroy C, Coulombel L. Coexpression of two fibronectin receptors, VLA-4 and VLA-5, by immature human erythroblastic precursor cells. **J Clin Invest.** 1991;87(1):6-11.

Serjeant GR. Sickle-cell disease. **Lancet.** 1997;350(9079):725-30.

Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. **Hematol Oncol Clin North Am.** 2005;19(5):943-56.

Schacter L, Warth JA, Gordon EM, Prasad A, Klein BL. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **FASEB J.** 1988;2(3):237-43.

Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. **Semin Hematol.** 1990;27(1):70-82.

Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. **Blood.** 1993;81(11):2827-43.

Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N Engl J Med.** 1997;337(22):1584-90.

Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. **Blood.** 2001;97(7):1937-41.

Sonati MF, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J Pediatr.** 2008;84(4 Suppl):S40-51.

Steinberg MH, Nagel RL, Lawrence C, Swaminathan V, Lu ZH, Plonczynski M, Harrell A. Beta-globin gene haplotype in Hb SC disease. **Am J Hematol.** 1996;52(3):189-91.

Steinberg MH. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med.** 1999;340(13):1021-30.

Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** 2005;129(4):465-81.

Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacol Sci.** 2006;27(4):204-10.

- Steinberg MH, Adewoye AH. Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol**. 2006;13(3):131-6.
- Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. **Semin Hematol**. 2001;38(4):299-306.
- Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **ScientificWorldJournal**. 2008;8:1295-324.
- Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT, Frid MG. Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. **J Appl Physiol**. 2005;98(2):715-21.
- Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. **Lancet**. 2004;364(9442):1343-60
- Styles LA, Lubin B, Vichinsky E, Lawrence S, Hua M, Test S, Kuypers F. Decrease of very late activation antigen-4 and CD36 on reticulocytes in sickle cell patients treated with hydroxyurea. **Blood**. 1997;89(7):2554-9.
- Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. **Blood**. 1998;92(10):3924-35.
- Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler M, Wick TM. Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. **Blood**. 1993;82(6):1891-9.
- Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. **Blood Cells Mol Dis**. 2006;37(1):12-20.
- Tamagnini GP, Lopes MC, Castanheira ME, Wainscoat JS, Wood WG. Beta + thalassemia--Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of beta thalassaemia. **Br J Haematol**. 1983;54(2):189-200.
- Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Hematology**. 2004;9(1):61-4.
- Telen MJ. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. **Semin Hematol**. 2000;37(2):130-42.

Thein SL. β -Thalassaemia. In: Rodgers GP. **Baillière's Clinical Haematology**. London: Bailliere Tindall, 1998;11:91-126.

Thein SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. **Haematologica**. 2005;90(5):649-60.

Thommesen L, Sjursen W, Gåsvik K, Hanssen W, Brekke OL, Skattebøl L, Holmeide AK, Espevik T, Johansen B, Laegreid A. Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. **J Immunol**. 1998;161(7):3421-30.

Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. **J Lab Clin Med**. 2001;137(6):398-407.

Tuzmen S, Schechter AN. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. **Blood Rev**. 2001;15(1):19-29.

Uguccioni M, Meliconi R, Nesci S, Lucarelli G, Ceska M, Gasbarrini G, Facchini A. Elevated interleukin-8 serum concentrations in beta-thalassemia and graft-versus-host disease. **Blood**. 1993;81(9):2252-6.

Vives Corrons JL, Miguel-García A, Pujades MA, Miguel-Sosa A, Cambiazso S, Linares M, Dibarrart MT, Calvo MA. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. **Eur J Haematol**. 1995;55(5):327-31.

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 beta-thalassaemia or sickle cell disease. **Br J Haematol**. 2006;135(2):254-63.

Weatherall DJ. The Thalassaemias. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles RW. **Hematology**. 4th Ed. New York: McGraw Hill Book Company, 1990.

Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. (2001) **The Thalassaemia Syndromes**. 4th ed. Blackwell Science, Oxford.

Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2007;34(9):926-32.

Wun T, Paglieroni T, Rangaswami A, Franklin PH, Welborn J, Cheung A, Tablin F. Platelet activation in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol**. 1998;100(4):741-9.

Yusuf-Makagiansar H, Makagiansar IT, Hu Y, Siahaan TJ. Synergistic inhibitory activity of alpha- and beta-LFA-1 peptides on LFA-1/ICAM-1 interaction. **Peptides**. 2001 (12):1955-62.

Zago M.A. Talassemias. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004, Cap. 31, p. 309-328.

Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter**. 2007;29(3):207-214.

Anexo

Comitê de Ética em Pesquisa

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 030/2007

Título do Projeto: Características de Expressão Gênica e Protéica das Moléculas de Adesão em Glóbulos Vermelhos e Neutrófilos de Pacientes com Hemoglobinopatias SC e S/βeta Talassemia.

Instituição Solicitante: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE

Local de Desenvolvimento do Projeto: Laboratórios de Hemoglobinopatias-UNILABE

Responsável: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Identidade: 5867375 - CPF: 987.061.525-20

Endereço: Rua, Roxo Moreira, 1450/01 –Cidade Universitária- Campinas – SP – CEP 13083-592.

Telefone: 19 – 3521-8661

Finalidade: Tese de Doutorado

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Objetivo: Analisar a expressão e atividade das moléculas de adesão em células vermelhas e neutrófilos de pacientes com doença falciforme SC e S/βeta talassemia.

Objetivos Específicos: Avaliar a expressão gênica das moléculas de adesão VLA-4 e CD 36 em células vermelhas de pacientes com doença falciforme SC e S/βeta - talassemia, através de Real Time PCR; Avaliar a expressão gênica das moléculas de adesão LFA-1, MAC-1 e VLA-4 em neutrófilos de pacientes com doença falciforme SC e S/βeta - talassemia, através de Real Time PCR; Avaliar a expressão das moléculas de adesão VLA-4 e CD 36 na superfície dos reticulócitos de pacientes com doença falciforme SC e S/βeta - talassemia através da citometria de fluxo; Avaliar a expressão celular dos antígenos VLA-4, MAC-1 e LFA-1 na membrana de neutrófilos de pacientes com doença falciforme SC e S/βeta -talassemia através de citometria de fluxo; Avaliação da atividade das moléculas de adesão nas células vermelhas de pacientes com doença falciforme SC e S/βeta -talassemia, por ensaio de adesão *in vitro*; Avaliar a capacidade quimiotática dos neutrófilos na doença falciforme SC e S/βeta -talassemia, através de ensaio de quimiotaxia *in vitro*.

3 - PARECER DO RELATOR:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 030/07, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 – INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3)
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro – e enviar notificação ao CEP e a ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente a ANVISA, o pesquisador ou patrocinador devem enviá-los também a ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e)
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 19/12/2007


Maria Emilia dos Santos
Coordenadora

Rua Joaquim Nabuco, 171 Graças- Recife-PE CEP: 52011.000 PABX: (81) 3416.4600
homepage: www.hemope.pe.gov.br

E-mail: cep.hemope@gmail.com- Tel: 81- 3416-4771
GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO – SECRETARIA DE SAÚDE