

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



PEDRO RODRIGUES SOUSA DA CRUZ

ANÁLISE BIOQUÍMICA E GENÉTICA DAS VIAS DE ADESÃO
CELULAR E CRESCIMENTO VASCULAR: ASSOCIAÇÃO COM O
DESENVOLVIMENTO DE RETINOPATIA FALCIFORME

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Pedro Rodrigues Sousa da Cruz
Dr. Pedro Rodrigues Sousa da Cruz
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Genética e Biologia
Molecular, na área de
Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL'EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C889a	Cruz, Pedro Rodrigues Sousa da, 1987- Análise bioquímica e genética das vias de adesão celular e crescimento vascular: associação com o desenvolvimento de retinopatia falciforme / Pedro Rodrigues Sousa da Cruz. – Campinas, SP: [s.n.], 2012. Orientador: Mônica Barbosa de Melo. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Retinopatia falciforme. 2. Genética. 3. Adesão celular. 4. Adesão vascular. I. Melo, Mônica Barbosa de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em Inglês: Genetic and biochemical analysis of cell adhesion and vascular growth pathways: association with sickle cell retinopathy development

Palavras-chave em Inglês:

Sickle retinopathy

Genetics

Cell adhesion

Vascular adhesion

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Edi Lúcia Sartorato

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Data da defesa: 29-02-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato


Assinatura

Profa. Dra Cláudia Vianna Maurer Morelli


Assinatura

Dra. Fernanda Caroline Scardi


Assinatura

Dr. Fábio Rossi Torres .


Assinatura

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	12
1.1. Constituição das hemoglobinas saudáveis	12
1.2. Variantes anômalas de hemoglobina	12
1.3. Hemoglobina S e polimerização	14
1.4. perturbação do equilíbrio da membrana plasmática	16
1.5. Hemólise e equilíbrio de óxido nítrico	17
1.6. Hemoglobina S e vaso-occlusão	18
1.7. Manifestações das doenças falciformes	19
1.8. Tratamento	19
1.9. Retinopatia falciforme	20
1.9.1. Classificação da retinopatia falciforme	20
1.9.2. Manifestações da retinopatia falciforme	22
1.9.3. Incidência e prevalência da retinopatia falciforme proliferativa	23
1.9.4. Proteínas envolvidas na etiologia da retinopatia falciforme	24
1.9.5 Bases genéticas das retinopatias proliferativas	27
OBJETIVOS	28
2.1. Objetivos gerais	28
2.2. Objetivos específicos	28
CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
3.1. Casuística	29
3.2. Metodologia	31
3.2.1. Coleta do Plasma	31
3.2.2. Quantificação de Proteínas Plasmáticas	31
3.2.3. Análise genética	32
3.2.4. Análise estatística	33
RESULTADOS	34
4.1.1. Concentração plasmática de angiopoietina-1	34

4.1.2. Concentração plasmática de angiopoietina-2	36
4.1.3. Concentração plasmática de VCAM-1 circulante	38
4.1.4. Concentração plasmática de ICAM-1 circulante.....	40
4.1.5. Concentração plasmática de Selectina-E circulante	42
4.1.6. Concentração plasmática de Selectina-P circulante	44
4.1.7. Concentração plasmática de VEGF.....	46
4.2. Correlações entre dosagens plasmáticas e dados clínicos	48
4.3. Análise genética	50
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO I	63
ANEXO II	66

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-1	angiopoietina 1
Ang-2	angiopoietina 2
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
dl	decilitro
dNTP	didesoxinucleotídeos
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio enzimático imunoabsorbente
FGF-2	fator de crescimento de fibroblastos
g	gravidade
HbA	hemoglobina A
HbA2	hemoglobina A2
HbC	hemoglobina C
HbF	hemoglobina F
HbS	hemoglobina S
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HU	hidroxiuréia
Kb	quilobase
kDa	quilodalton
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro

NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NO	óxido nítrico
pb	pares de bases
pg	picograma
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEDF	fator de derivado do epitélio pigmentar
r	coeficiente de correlação linear de Pearson
RNA	ácido ribonucléico
SNP	polimorfismo de base única
sICAM-1	molécula de adesão intercelular-1 circulante
sVCAM-1	molécula de adesão vascular-1 circulante
sSelectina-E	Selectina-E circulante
sSelectina-P	Selectina-P circulante
μl	microlitro
μm	micrômetro
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
°C	graus centígrados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados dos pacientes.	31
Tabela 2. <i>Primers</i> diretos e reversos empregados na amplificação das sequências-alvo nos gene <i>PEDF</i>	32
Tabela 3. Correlações de biomarcadores plasmáticos e parâmetros clínicos em pacientes HbSS e HbSC.	49
Tabela 5. Genótipos dos polimorfismos-358G/A (rs12948385) e -790T/C (rs12150053) no gene <i>PEDF</i> nos diferentes grupos estudados.....	50
Tabela 6. Proporções dos genótipos do polimorfismo -358G/A (rs12948385).....	50
Tabela 7. Proporções dos genótipos do polimorfismo -790T/C (rs12150053).	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de falcização do eritrócito por polimerização de HbS.	15
Figura 2. Retina superior de indivíduo portador de anemia falciforme	21
Figura 3. Classificação dos pacientes conforme o índice de gravidade da doença falciforme	30
Figura 4. Concentração plasmática de angiopoietina-1 em pg/mL	35
Figura 5. Concentração plasmática de angiopoietina-2 em pg/mL	37
Figura 6. Concentração plasmática de sVCAM-1 em ng/mL	39
Figura 7. Concentração plasmática de sICAM-1 em ng/mL	41
Figura 8 Concentração plasmática de sSelectina-E em ng/mL	43
Figura 9 Concentração plasmática de sSelectina-P em ng/mL	45
Figura 10. Concentração plasmática de VEGF em pg/mL.....	47

RESUMO

As doenças falciformes são caracterizadas pela presença de hemoglobina S (HbS), que favorece a formação de hemácias falcizadas por meio de sua polimerização no estado desoxigenado. Os indivíduos homozigotos para o alelo da hemoglobina S são acometidos pela anemia falciforme, enquanto os heterozigotos podem desenvolver outras doenças falciformes (especialmente a hemoglobinopatia SC) ou apresentar o traço falciforme (HbAS). As hemácias falciformes têm maior tendência a aderir-se ao endotélio vascular, resultando em obstrução vascular e hipóxia, que, por sua vez, gera danos teciduais sistêmicos. A retinopatia falciforme é uma afecção ocular derivada da vaso-oclusão na microvasculatura da retina conduzindo a sua hipóxia e neovascularização, podendo levar à perda da visão. Além da obstrução vascular por hemácias anômalas, outros fatores como ativação do endotélio, ação leucocitária, viscosidade sanguínea e expressão de fatores angiogênicos contribuem para a fisiopatologia desta complicação. O estudo de proteínas envolvidas no equilíbrio entre angiogênese e sua inibição, assim como daquelas relacionadas à adesão das hemácias falcizadas ao endotélio vascular podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de origem e evolução da retinopatia falciforme. As moléculas Ang-1, Ang-2, sSelectina-E, sSelectina-P, sVCAM-1, sICAM-1 e PEDF foram eleitas como potenciais biomarcadores da gravidade e complicações das doenças falciformes (em suas formas SS e SC), especialmente a retinopatia, devido ao papel desempenhado por cada uma na resposta inflamatória, adesão celular ou angiogênese.

ABSTRACT

Sickle cell diseases are characterized by the presence of hemoglobin S (HbS), which favors the formation of sickled red cells through its polymerization in deoxygenated state. Homozygous individuals for the hemoglobin S allele are affected by sickle cell anemia, while heterozygotes individuals may develop other sickle cell diseases (especially hemoglobin SC) or the sickle cell trait (Hb). The sickle erythrocytes have a higher tendency to adhere to the vascular endothelium, resulting in vascular obstruction and hypoxia, which in turn generates systemic tissue damage. Sickle cell retinopathy is an eye disorder derived from vaso-occlusion in the microvasculature of the retina leading to its hypoxia and neovascularization, which can lead to vision loss. In addition to vascular obstruction by abnormal red blood cells, other factors such as activation of the endothelium, leukocyte action, blood viscosity and expression of angiogenic factors contribute to the pathophysiology of sickle cell retinopathy. Thus, the study of proteins involved in the balance between angiogenesis and its inhibition, as well as those related to the adhesion of sickled red blood cells (sRBCs) to the vascular endothelium could be helpful in understanding the mechanisms of origin and evolution of sickle cell retinopathy. Patients evaluated had soluble ICAM-1 (sICAM-1) elevated in the HbSC non-retinopathy group ($p=0.0121$). Furthermore, angiopoietins-1 (Ang-1) and 2 (Ang-2) levels were altered in sickle cell disease (SCD). Furthermore, HbSS presented higher levels of Ang-2 compared to HbSC.

INTRODUÇÃO

1.1. Constituição das hemoglobinas saudáveis

Em 1926 por meio da técnica de ultra-centrifugação foi determinada a constituição da hemoglobina como um tetrâmero 66,8 kDa. No entanto, sua estrutura molecular foi demonstrada apenas em 1970 (PERUTZ, 1970).

A hemoglobina é uma metaloproteína composta por um heterotetrâmero de duas subunidades de cadeias do tipo α -globina de 141 aminoácidos cada e duas subunidades de cadeias do tipo não- α de 146 aminoácidos cada. Os monômeros encontram-se ligados a um grupamento prostético heme, responsável pela associação reversível ao oxigênio.

Os genes que codificam as diferentes cadeias globínicas são membros de uma mesma família ancestral. As cadeias do grupo α -globina são codificadas em um segmento de 35kb do cromossomo 16 pelos genes ξ , $\alpha 1$ e $\alpha 2$, enquanto os genes das cadeias do tipo β -globina encontram-se no cromossomo 11, ao longo de 60kb e são denominados ε , γ^G , γ^A , δ e β (MAVILIO *et al.*, 1983). Em ambos os *clusters* se observa a disposição dos genes na ordem em que são expressos ao longo do desenvolvimento para a formação das hemoglobinas ($\xi_2\varepsilon_2$, $\xi_2\gamma_2$ e $\alpha_2\varepsilon_2$), fetal ($\alpha_2\gamma_2$, HbF) e adultas ($\alpha_2\beta_2$, HbA e $\alpha_2\delta_2$, HbA₂).

1.2. Variantes anômalas de hemoglobina

Há mais de 700 variantes descritas da hemoglobina, em sua vasta maioria, resultantes de mutações pontuais nas cadeias α , γ , β , ou δ , muitas das quais não resultam em alteração fenotípica (DRISS, 2008). As variantes advindas de mutação *missense* se

manifestam em variação estrutural e são denominadas hemoglobinopatias, as doenças genéticas de maior distribuição global (entre as mais frequentes na maior parte das populações figuram a HbS, HbC, HbE, e HbD-Punjab). Mutações de ponto em regiões não codificadoras afetando a estrutura de mRNA e regiões regulatórias dos genes das cadeias de globina estão relacionadas às diferentes talassemias, sendo outras alterações genéticas mais raras as responsáveis pelas hemoglobinas *Constant Spring* (substituição de códon de parada por sequência codificadora) e *Lepore* (fusão dos genes δ e β).

Sendo a variante mais comum, a hemoglobina S (HbS, $\alpha_2\beta_2^S$) caracteriza o conjunto de hemoglobinopatias denominadas doenças falciformes. A primeira descrição desta condição se deu em 1910 por Herrick ao observar eritrócitos de morfologia anômala em um estudante jamaicano portador de grave quadro anêmico (HERRICK, 1910), sendo proposta primeiramente por Neel a manifestação da anemia falciforme como decorrente de um estado homozigoto. A heterozigose seria responsável por falcização menos frequente e quadro assintomático (traço falciforme) (NEEL, 1949). Deve-se a Pauling e cols. a distinção da HbS da forma adulta saudável (HbA) por seu ponto isoelétrico e migração eletroforética, permitindo identificar sua ocorrência em conjunto com HbA de modo a discriminar traço e anemia falciforme (PAULING; ITANO, 1949).

Em 1956 revelou-se como fundamento genético da HbS a mutação pontual na sexta posição da cadeia da β -globina (GAG $\rightarrow$ GTG), a qual resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma valina ($\beta_6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$) (INGRAM, 1956).

1.3. Hemoglobina S e polimerização

A HbS apresenta cinco haplótipos atualmente reconhecidos como de origens étnica e geográfica distintas: CAR (República Centro Africana) ou Bantu no centro-sul e leste africano; o tipo Benin (BEN) originado no meio-oeste africano; o tipo Senegal (SEN) característico da África atlântica; o tipo Saudita ou Árabe-indiano presente na península arábica e na Índia e o tipo Camarões encontrado nos limites geográficos deste país e numa pequena parte da costa oeste africana (ADEKILE, 1997; LAPOUMÉROULIE *et al.*, 1992; NAGEL, 1994). Cada haplótipo corresponde a um evento independente de surgimento de HbS e a manutenção desta deveu-se à seleção balanceada, tendo em vista o caráter protetor do alelo para a infecção por *Plasmodium falciparum*, de alta incidência nas regiões citadas (do mesmo modo ocorre para HbC e HbD) (CAVALLI-SFORZA, 1981).

A presença da valina na posição seis da globina β favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio, redução de pH e/ou aumento de temperatura (figura 1). Uma vez que as moléculas de hemoglobina encontram-se em concentração muito alta intracelularmente (32-34 g/dl), tal compactação exige grande solubilidade (BUNN, 1997). Com a desoxigenação da hemoglobina, há a criação de um sítio hidrofóbico pela Val- β 6 exposta na superfície da molécula e os resíduos Phe-85 β e Leu-88 β das cadeias adjacentes cumprem o papel de região aceptora (CHATTERJEE *et al.*, 1982). A partir de um único ponto de nucleação, as moléculas de hemoglobina agregam em polímeros helicoidais de 14 unidades, os quais atuam como molde para a formação de longos feixes no interior do eritrócito (EATON & HOFRICHTER, , 1995). Com a drástica redução da solubilidade ocasionada pela mutação estrutural e pelo mecanismo de polimerização em cadeia descrito, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) adquire também importância para a falcização.

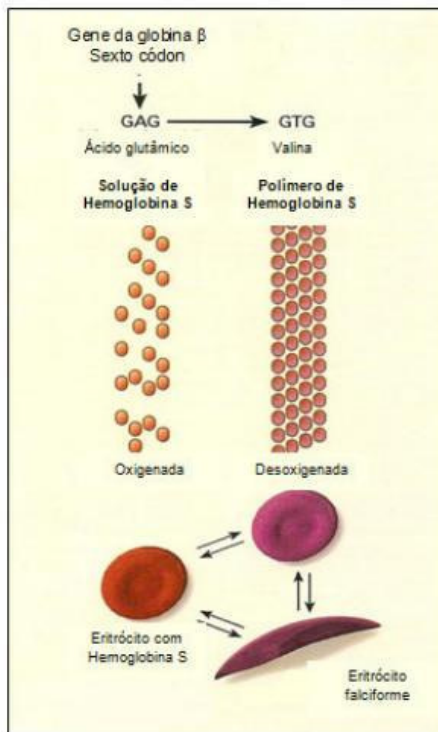


Figura 1. Processo de falcização do eritrócito por polimerização de HbS (adaptado de MAY, 2010).

A velocidade com que ocorre o início da polimerização depende da concentração de HbS elevada entre sua vigésima e quadragésima potência (EATON.; HOFRICHTER, 1987), com a redução da CHCM em 1g/dl ocasionando o atraso do início de formação de polímeros ao dobro do tempo (EMBURY, 1985).

A coocorrência com outros tipos de hemoglobina é ainda determinante para a tendência de polimerização da HbS (HEBBEL, ROBERT P *et al.*, 2004). A HbF ($\alpha_2\gamma_2$) e HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) limitam a polimerização em maior medida que HbC ($\alpha_2\beta_2^C$) e HbA ($\alpha_2\beta_2$), em virtude da ausência de cadeias β na composição das primeiras. Os haplótipos SEN e Árabe-indiano estão associados com níveis de HbF elevados (superiores a 15%) em relação aos haplótipos BEN (de 5 a 15%) e CAR/Bantu (abaixo

de 5%) (HORIUCHI *et al.*, 1995; MUSUMECI *et al.*, 1981), motivo pelo qual muitas vezes o haplótipo é aludido como fator modificador do potencial de polimerização.

1.4. perturbação do equilíbrio da membrana plasmática

A reincorrência e a magnitude da polimerização perturbam a estabilidade da membrana plasmática e podem conduzir à deformação irreversível do eritrócito, o qual usualmente toma a forma de foice (JOINER, 1993).

Em um estudo clássico de 1952 foi demonstrado pela primeira vez que a falcização apresenta-se fortemente relacionada com o conteúdo iônico dos eritrócitos, nomeadamente depleção de K^+ e aumento de Na^+ (TOSTESON *et al.*, 1952), com resultante perda de água e aumento na densidade dos eritrócitos, favorecendo o aumento de polímeros de HbS (BRUGNARA, 2003). Ao menos três vias de troca iônica encontram-se modificadas, a Na^+/K^+ -ATPase induzida por desoxigenação e promotora da influxo de Ca^{2+} , o qual afeta o canal de Gardos (LEW *et al.*, 1985), além do cotransporte K^+-Cl^- , ativado em pH inferior a 7,4 (BRUGNARA, *et al.*, 1989). Tais achados motivaram a interpretação de que a deformação do eritrócito por fibras de HbS seja a responsável pelo fluxo catiônico anormal, uma vez que a alteração de permeabilidade é tão maior quanto maior for a o grau de alteração morfológica do eritrócito (MOHANDAS *et al.*, 1986). Certas populações de eritrócitos falcizados exibem acentuada mudança de perfil catiônico e são os responsáveis primários nas alterações reológicas das doenças falciformes (BRUGNARA, 2003).

Este grupo celular irreversivelmente falcizado exibe grande densidade celular e pode alcançar valores de CHCM próximos a 50 g/dl. Células densas são menos observadas quando há maior concentração de HbF nos eritrócitos ou a HbS co-existe

com α -talassemia, porquanto reduzem a concentração de hemoglobina (FABRY *et al.*, 1984). A proporção de células irreversivelmente falcizadas e a sobrevivência dos eritrócitos estão inversamente relacionados (SERJEANT, 1969).

1.5. Hemólise e equilíbrio de óxido nítrico

A meia-vida dos eritrócitos é em média de sete dias, em contraste aos 60 dias de hemácias normais (HEBBEL, *et al.*, 2009). A grande taxa de hemólise observada é em sua maior parte derivada da elevada eritrofagocitose de monócitos e neutrófilos nos tecidos extra-vasculares e é desencadeada principalmente pela ligação de anticorpos à membrana eritrocítica, mais sensível à lise mediada por sistema complemento (HEBBEL *et al.* 1984). No ambiente intravascular ocorre a ruptura mecânica das células falcizadas, e esta responde por um terço dos eventos de hemólise e como causa principal de liberação de hemoglobina no plasma (HEBBEL, *et al.*, 2009)

A hemoglobina plasmática consome óxido nítrico (NO), formando metahemoglobina e nitrato bioativo. Heme e íons de ferro liberados, bem como a hemoglobina, catalisam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), já aumentada nas doenças falciformes por ação de xantina oxidase (HOUSTON *et al.*, 1999), mieloperoxidase (BALDUS *et al.*, 2002), NADPH oxidase (WOOD *et al.*, 2005) e leucócitos (HEBBEL *et al.*, 2004), reduzindo a biodisponibilidade de NO (KATO *et al.*, 2007). A arginase posta em circulação por eritrócitos lisados consome L-arginina, substrato da óxido nítrico sintetase e precursora de NO. Dado o papel deste na geração de guanosina monofosfato cíclico e relaxamento da musculatura lisa, sua depleção incorre em vasoconstrição e consequente desequilíbrio da homeostase vascular, refletido em ativação endotelial e plaquetária (KATO *et al.*, 2007).

1.6. Hemoglobina S e vaso-oclusão

A retenção de eritrócitos densos em vênulas pós-capilares é o fenômeno mais marcante nas doenças falciformes, juntamente com a obstrução microvascular (KAUL *et al.*, 1986). A extensão da adesão é inversa e intensamente relacionada ao diâmetro do vaso e se dá conforme a densidade do eritrócito (KAUL *et al.*, 1989). Células mais densas são retidas ao acaso na rede pós-capilar, não obstante de maneira preferencial em vênulas com diâmetro entre 7,0 e 10,0 μm , localidades em que já se encontram aderidas células menos densas em concentração de 1,0/100 μm^2 , próxima do limiar de bloqueio do vaso (KAUL *et al.*, 1989).

Tanto a velocidade de fluxo quanto a tensão de cisalhamento (pressão tangencial do fluido na parede do vaso) têm sua taxa mais alta nas arteríolas, seguindo-se a abrupta queda de ambos conforme os eritrócitos alcançam os vasos imediatamente posteriores aos capilares (LIPOWSKY *et al.*, 1978), ponto cuja aderência é mais acentuada. A retenção é reduzida de modo consistente com a retomada de velocidade e taxa de cisalhamento ao longo de vasos mais calibrosos e de ramificações mais esparsas (KAUL *et al.*, 1989), dado que a topografia exerce influência.

A combinação de obstrução pré-capilar e detenção de células densas induz hipóxia local e estimula a polimerização de HbS de tal modo que a contenção passe a abranger vasos contíguos em perímetro maior (KAUL *et al.*, 1989).

A despeito do protagonismo dos eritrócitos densos para a vaso-oclusão, observou-se que a proporção destes não prediz a gravidade das complicações decorrentes das doenças falciformes (BILLETT *et al.*, 1986) exceção feita ao componente hemolítico (BUNN, 1997; KAUL, *et al.*, 1996)

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia que leva à formação de hemácias anômalas, sendo a doença monogênica mais comum no Brasil (MANFREDINI *et al.*, 2007). Atinge frequentemente, mas não exclusivamente, indivíduos de origem africana, chegando a acometer 0,1 a 0,3% da população negróide, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população, devido ao alto grau de miscigenação do país (BANDEIRA, F. M. G. C. *et al.*, 1999).

1.7. Manifestações das doenças falciformes

As manifestações clínicas, tais como vaso-oclusão, necrose avascular da medula óssea e fibrose esplênica progressiva, se devem, principalmente, à hipóxia resultante da obstrução dos vasos sanguíneos por acúmulo de eritrócitos falcizados, além da destruição precoce destes (BRUGNARA, CARLO, 2003). Os órgãos que sofrem maiores riscos são aqueles com seio venoso, onde a circulação do sangue é lenta e a tensão de oxigênio e pH são baixos, ou aqueles com limitada suplementação de sangue arterial, como olhos e cabeça do fêmur (MANFREDINI *et al.*, 2007).

Os sintomas da hipóxia podem ser agudos com crises dolorosas ou insidiosas. Esta última categoria envolve a necrose asséptica de quadris e retinopatia falciforme. Os efeitos dos danos teciduais agudos ou crônicos podem resultar na falência do órgão, principalmente em pacientes com idade avançada (MANFREDINI *et al.*, 2007).

1.8. Tratamento

A porcentagem de mortalidade entre crianças menores de cinco anos com anemia falciforme é de 25 a 30%. Como as maiores taxas de mortalidade ocorrem nos dois primeiros anos de vida, a inclusão obrigatória da pesquisa de hemoglobinopatias no

exame de triagem neonatal vem se mostrando uma medida importante para a redução dessas taxas, pois permite a identificação precoce desses indivíduos e a consequente conduta clínica adequada e acompanhamento ambulatorial regular (MANFREDINI et al., 2007).

Hoje, muitos pacientes portadores de doenças falciformes fazem uso da hidroxiuréia, uma droga citotóxica que aumenta os níveis de HbF (MANFREDINI et al., 2007).

1.9. Retinopatia falciforme

O fenômeno de vaso-oclusão pode também ser observado na microvasculatura ocular. Esta complicação pode acarretar comprometimento da visão dependendo de sua localização e do tecido afetado.

As manifestações oculares nas doenças falciformes são representadas por alterações orbitárias, conjuntivais, uveais, papilares e retinianas (BANDEIRA, D. M.; SILVA, 2007). As alterações retinianas são as mais importantes para a morbidade ocular nas doenças falciformes, especialmente sua forma proliferativa, que se configura como a maior causa de perda progressiva da visão nesses pacientes (LUTTY; MCLEOD, 2008), levando ao comprometimento visual em 10 a 20% dos olhos afetados (BANDEIRA; SILVA, 2007).

1.9.1. Classificação da retinopatia falciforme

A classificação da retinopatia falciforme proposta por Goldberg (GOLDBERG, 1971) consiste de cinco estágios baseados em diferentes alterações fisiopatológicas

observadas por meio de exames angiográficos da retina. De acordo com esse sistema, o estágio I é caracterizado pela oclusão arteriolar definitiva, com consequente hipóxia retiniana e rearranjo dos capilares adjacentes. No estágio seguinte (estágio II), há reorganização vascular, com a formação de anastomoses arterio-venulares. A neovascularização pré-retiniana originada pelas anastomoses ocorre no estágio III, havendo a formação de uma estrutura em leque que lembra o invertebrado marinho *Gorgonia flabellum* (“sea fan”, figura 2). Estas estruturas neovasculares muito frequentemente sofrem auto-infartos, possivelmente pelas características pouco usuais do fluxo. Os novos vasos são frágeis, imaturos e aderentes ao gel vítreo. Isso facilita a ocorrência de hemorragia vítrea e caracteriza o estágio IV da retinopatia na doença falciforme. A repetição destes fenômenos hemorrágicos potencializa a tração criada pelo tecido fibroglial e a adesão do vítreo aos neovasos, levando à rotura e descolamento da retina (estágio V), maior causa da perda de visão nesses pacientes (MOHAN *et al.*, 2005).



Figura 2. Retina superior de indivíduo portador de anemia falciforme visualizada por técnica de histoquímica enzimática (LUTTY & MCLEOD, 1992). A seta indica uma formação neovascular (sea fan). (Figura extraída de LUTTY *et al.*, 2008).

A retinopatia não-proliferativa corresponde aos estágios I e II, enquanto a retinopatia proliferativa está relacionada aos estágios III, IV e V (LUTTY, GERARD; MCLEOD, 2008).

1.9.2. Manifestações da retinopatia falciforme

O evento inicial na patogênese da retinopatia é a oclusão arteriolar, que ocorre geralmente na região periférica da retina e não indica, necessariamente, que o paciente vá progredir para a fase proliferativa da doença. Tortuosidade, dilatação e formação de microaneurismas na rede capilar são também observadas na fase inicial. Essas irregularidades na fase não-proliferativa levam à formação de hemorragias intra-retinianas denominadas *salmon patches*, ocasionadas possivelmente por necrose isquêmica da parede do vaso (BANDEIRA, D. M.; SILVA, 2007), podendo alcançar mais de 2,0 mm de diâmetro (LUTTY; MCLEOD, 2008) e dar origem à retinosquise (DOWNES *et al.*, 2005). Hemorragias sub-retinianas chamadas *black sunbursts* e manchas iridescentes são decorrentes da migração, hiperplasia e hipertrofia de pigmento, eventos estimulados pelo sangue localizado profundamente na retina (LUTTY; MCLEOD, 2008).

A isquemia local resultante de repetidos episódios de oclusão arteriolar é considerada o motivo mais provável da angiogênese. A neovascularização periférica da retina assume a forma frondosa (*sea fan*) na borda da retina avascular, podendo ser observados neovasos também na região interna da retina (LUTTY; MCLEOD, 2008).

Mesmo neovascularizações em *sea fan* de pequena dimensão são capazes de provocar hemorragia vítrea (10). Esta se deve à constante transudação de componentes sanguíneos para o vítreo através de tecido neovascular incapacitado. Quando esta

hemorragia atinge o eixo visual, causa sintomas de "moscas volantes" e de redução ou perda da visão (DOWNES *et al.*, 2005). A repetição desses fenômenos hemorrágicos causa agravamento da tensão vítreo-retiniana (DOWNES *et al.*, 2005), o que pode provocar descolamento regmatogênico e tracional da retina (LUTTY; MCLEOD, 2008).

1.9.3. Incidência e prevalência da retinopatia falciforme proliferativa

Existe uma relação inversa entre a gravidade da doença sistêmica e a gravidade da retinopatia em homozigotos (HbSS) versus heterozigotos (HbSC). Pacientes com doença falciforme homozigota têm mais complicações sistêmicas com eventos vaso-oclusivos múltiplos e dano orgânico secundário (DOWNES *et al.*, 2005). Pacientes heterozigotos têm menos complicações sistêmicas, porém apresentam maior frequência e início precoce de neovascularização retiniana (GOLDBERG, 1971). Uma estimativa da prevalência da retinopatia falciforme proliferativa é de 32,8% na doença da hemoglobina SC, 14% na SThal e 2,6% na SS (CLARKSON, 1992).

Os eventos pré-proliferativos (estágios I e II de Goldberg) ocorrem em dois terços dos pacientes, independentemente do genótipo. O genótipo SC, além de estar mais associado ao desenvolvimento de retinopatia (BANDEIRA, D. M.; SILVA, 2007), apresenta evolução aos estágios IV e V mais frequentemente (LUTTY; MCLEOD, 2008). O descolamento da retina é um evento raro em indivíduos com a anemia falciforme ou com o traço falciforme (LUTTY; MCLEOD, 2008).

Em um estudo prospectivo longitudinal, Downes (DOWNES *et al.*, 2005) observou que a incidência anual de retinopatia falciforme em indivíduos jamaicanos com genótipo SC é de 2,5%, ao passo que em indivíduos SS essa taxa é de 0,5%.

Além disso, as oclusões vasculares retinianas causadas pelas células falciformes em homozigotos resultam em oclusão vascular mais completa (infarto do vaso), causando necrose do tecido retiniano. Já as oclusões vasculares menos severas da doença SC resultam em uma retina cronicamente isquêmica, que proporciona um ambiente onde a secreção de fatores angiogênicos pelo tecido danificado é continuamente estimulada (LUTTY; MCLEOD, 2008).

A retinopatia proliferativa pode ocorrer em crianças, mas a faixa etária mais acometida pela doença é entre 15 e 29 anos (CLARKSON, 1992). Regressão espontânea da neovascularização tem sido relatada em 20 a 60% dos casos (GOLDBERG, 1971).

1.9.4. Proteínas envolvidas na etiologia da retinopatia falciforme

A vaso-oclusão responsável pela ativação da angiogênese é fortemente relacionada à interação anormal entre as hemácias falcizadas irreversíveis e o endotélio vascular (BANDEIRA, D. M.; SILVA, 2007). Existem fortes evidências, porém, de que a fisiopatologia da vaso-oclusão envolva mais do que a simples obstrução por eritrócitos rígidos e densos (LUTTY; MCLEOD, 2008). Em pontos de oclusão são encontrados, além de hemácias falciformes, leucócitos e plaquetas. Alguns tipos celulares expressam moléculas que promovem aderência ao endotélio vascular, como a integrina $\alpha 4 \beta 1$ (“Very Late Activation Protein 4”, *VLA-4*) de reticulócitos, que permite ligação à molécula de adesão vascular 1 ou “Vascular Cell Adhesion Molecule 1” (*VCAM-1*) (LUTTY; MCLEOD, 2008). Esta se mostrou elevada em indivíduos com doença falciforme, tendo função regulatória na adesão de linfócitos, monócitos e reticulócitos precursores de células falciformes (LUTTY, GERARD A; MCLEOD, 2008).

A adesão ao endotélio é estimulada, ainda, pela ativação direta das células endoteliais, que passam a expressar uma série de moléculas de adesão. A selectina-E e a selectina-P, por exemplo, modulam a rolagem de leucócitos na parede do vaso, enquanto *VCAM-1* e a molécula de adesão intercelular 1 ou “Intercellular Adhesion Molecule 1” (*ICAM-1*) são responsáveis pela posterior aderência firme ao endotélio. Essa ativação é favorecida por citocinas inflamatórias, observadas em maior número nesses pacientes possivelmente em decorrência da lesão tecidual produzida por isquemia (CAO *et al.*, 1999).

Indivíduos com doença falciforme apresentam taxas de neutrófilos, *ICAM-1*, *VCAM-1* e P-selectina mais elevadas, o que corrobora com a teoria de que leucócitos e reticulócitos se aderem ao endotélio vascular, ocasionando estase na microcirculação, maior tempo de circulação (polimerização aumentada de hemoglobina S) e, por fim, obstrução vascular. Além disso, acredita-se que os neutrófilos possam ligar-se aos eritrócitos falcizados e serem ativados (CAO *et al.*, 1999).

O hematócrito também desempenha um importante papel fisiopatológico, devido a sua influência na viscosidade do sangue. Isso pode explicar em parte a discrepância entre a gravidade das doenças SS, SC e SThal. Estas últimas tendem a possuir maior hematócrito, contribuindo para uma viscosidade ainda mais elevada e, portanto, maior oclusão na microvasculatura durante o processo de falcização. Usando um modelo animal, Mcleod (MCLEOD *et al.*, 1996), propôs que a vaso-oclusão em indivíduos com hemoglobinopatia SC pode estar mais condicionada a anormalidades no sistema fibrinolítico, interações leucocitárias, ativação do endotélio e maior expressão de moléculas de adesão do que com a interação eritrócito-endotélio (LUTTY; MCLEOD, 2008).

A causa precisa da angiogênese não é clara, mas sabe-se que o processo oclusivo resulta em isquemia local, o que presumivelmente estimula a produção de fatores de crescimento vascular. O fator de crescimento vascular endotelial (“Vascular Endothelial Growth Factor”, *VEGF*), um potente promotor de angiogênese, tem sua produção estimulada sob condições de hipóxia (BONANOMI *et al.*, 1988). Juntamente com o fator de crescimento de fibroblasto, ou “Fibroblast Growth Factor” (*FGF-2*), outro indutor angiogênico, o *VEGF* foi identificado em *sea fans* em quantidades significativamente altas (LUTTY, G A *et al.*, 1996). O *VEGF* interage com as células endoteliais por meio dos receptores de membrana *Flt-1* e *KDR*, sendo o papel do primeiro bem descrito em patologias envolvendo angiogênese (BONANOMI *et al.*, 1988).

O fator derivado do epitélio pigmentar da retina (“Pigment Epithelial Derived Factor”, *PEDF*), por outro lado, é um fator anti-angiogênico que inibe a migração endotelial e induz apoptose das células endoteliais neoformadas, sendo sua expressão estimulada por maior tensão de oxigênio e inibida pela hipóxia. Redução nos níveis de *PEDF* foi correlacionada ao desenvolvimento de neovascularização na retinopatia induzida por oxigênio (CAO *et al.*, 1999).

A angiogênese, proliferação e migração celular no processo vasoformativo são eventos fortemente controlados por estes dois fatores de ação antagônica. A relação entre *PEDF* e *VEGF*, dessa forma, é essencial no desenvolvimento ou regressão da neovascularização observada nas retinopatias proliferativas.

A razão *PEDF/VEGF* é especialmente relevante para o curso da retinopatia falciforme. Olhos comprometidos pela forma proliferativa da doença apresentam elevados níveis de *PEDF* e *VEGF* em vasos viáveis de *sea fans*. Por outro lado, somente

o *PEDF* é encontrado em vasos inviables (enfartados, ou seja, sem potencial de estimular angiogênese). O *PEDF* é proeminente, ainda, em regiões não-perfundidas (zona isquêmica) de indivíduos com a doença não-proliferativa e em *sea fans* atroficos, locais com fraco ou nenhum vestígio de *VEGF*. Com base nessas evidências, é provável que o *PEDF* iniba a angiogênese e induza regressão de *sea fans*, como indica a redução de seus níveis observada em numerosas doenças oculares, incluindo a retinopatia diabética proliferativa (CAO *et al.*, 1999). Soma-se a isso o fato de que a injeção intravítrea de *PEDF* inibe a neovascularização induzida por *VEGF*, conforme demonstrado em um modelo animal murídeo (KIM *et al.*, 2003).

1.9.5 Bases genéticas das retinopatias proliferativas

Devido às fortes evidências de atuação no balanço entre angiogênese e anti-angiogênese, dois genes de interesse no estudo de retinopatia falciforme proliferativa são o *VEGF* e o seu provável antagonista, o *PEDF*.

O gene *VEGF* está localizado na região 6p21-p12. Mutações em sua sequência promotora podem estar envolvidas em uma resposta angiogênica mais pronunciada. Awata *et al.* (2002), identificaram sete polimorfismos na região promotora, sendo que o SNP (*single nucleotide polymorphism*) -634C/G mostrou relação significativa com a retinopatia diabética (AWATA *et al.*, 2002). O mesmo polimorfismo mostrou-se relacionado, ainda, com degeneração macular relacionada à idade (CHURCHILL *et al.*, 2008) e retinopatia proliferativa da prematuridade (HAINES *et al.*, 2006). O polimorfismo -116G/A, também na região promotora do gene *VEGF*, apresentou forte correlação com a gravidade da retinopatia diabética (CHURCHILL *et al.*, 2008).

O gene *PEDF* foi mapeado na região 17pter-p13.1. A proteína PEDF é amplamente sintetizada no sistema nervoso, inclusive na retina (epitélio pigmentar da retina - EPR), onde deve agir no desenvolvimento ou diferenciação da retina neural. Recentemente foi descoberto que os polimorfismos -790C/T e -358G/A no gene *PEDF* representam fatores de risco para a retinopatia diabética (VANNAY *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Investigar os níveis plasmáticos das proteínas Ang-1, Ang-2, sVCAM-1, sICAM-1, sSelectina-E, sSelectina-P e VEGF em uma população brasileira de pacientes portadores de doença falciforme por meio de ensaios imunoenzimáticos.

Avaliar a frequência dos polimorfismos -790C/T e -358G/A no promotor do gene *PEDF* em uma população brasileira de pacientes com anemia falciforme (HbSS) e doença da hemoglobina SC (HbSC) com diagnóstico de retinopatia, além de pacientes com exame de fundo de olho normal.

2.2. Objetivos específicos

Analisar a correlação entre as dosagens plasmáticas e os diferentes genótipos (HbSS e HbSC), bem como quanto à presença e estágio da retinopatia quando presente.

Avaliar relação entre fatores plasmáticos e parâmetros clínicos levantados, assim como quanto ao cálculo de gravidade da doença falciforme.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Este é um estudo do tipo caso-controle, cujos indivíduos foram recrutados entre 2009-2011 no Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da Universidade de Campinas e da Fundação HEMOPE (Recife, PE). O grupo de estudo incluiu pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS) e hemoglobinopatia SC (HbSC), condições determinadas com base nos genótipos de hemoglobina inferido por padrão de banda eletroforético e por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O grupo controle incluiu indivíduos com genótipo HbAA do Hemocentro igualmente confirmados quanto ao genotipo e pareados por idade e sexo com os portadores de doença falciforme.

Os critérios de exclusão para a análise bioquímica basearam-se na presença de um dos seguintes parâmetros clínicos: transfusão de sangue dentro dos três meses anteriores, presença de doença maligna, diabetes, hipertensão sistêmica, gravidez, crise dolorosa no período compreendido nas duas semanas antes de exame ocular, opacidades de meios que impedisse fundoscopia de boa qualidade e terapia medicamentosa de longo prazo que não por hidroxiuréia (HU). Os pacientes também foram excluídos caso submetidos previamente a tratamento a laser ou intervenção cirúrgica por gravidade da retinopatia proliferativa.

O exame ocular consistiu de avaliação da retina por uma lâmpada de fenda com lente de 78 dioptrias, fundoscopia indireta com uma lente de 20 dioptrias e angiografia com fluoresceína (realizado por profissional do setor de retina do Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP).

Os pacientes tiveram seus dados clínicos levantados para as seguintes informações clínicas: dosagem de hemoglobina, lactato desidrogenase e bilirrubina; hematócrito, contagem de eritrócitos, reticulócitos e células brancas; sepse, pressão sistólica, volume cospuscular médio, registro de transfusão, crises álgicas, priapismo e síndrome torácica aguda. Com base nestes dados calculou-se o índice de gravidade da doença falciforme para cada paciente estudado, de acordo com o proposto por Sebastiani e colaboradores em 2005 (rede bayesiana para cálculo de gravidade disponível em <http://155.41.217.225/dss-calculator/index.php>). De um total de 82 indivíduos classificados, 44 apresentam a forma mais branda da doença (53%, grupo com índice médio de 0,166), 16 encontram-se na faixa intermediária (19% e índice médio 0,418), enquanto apenas 22 apresentam a forma considerada grave (28%, com 0,874 de valor médio), como pode ser averiguado na figura 3).

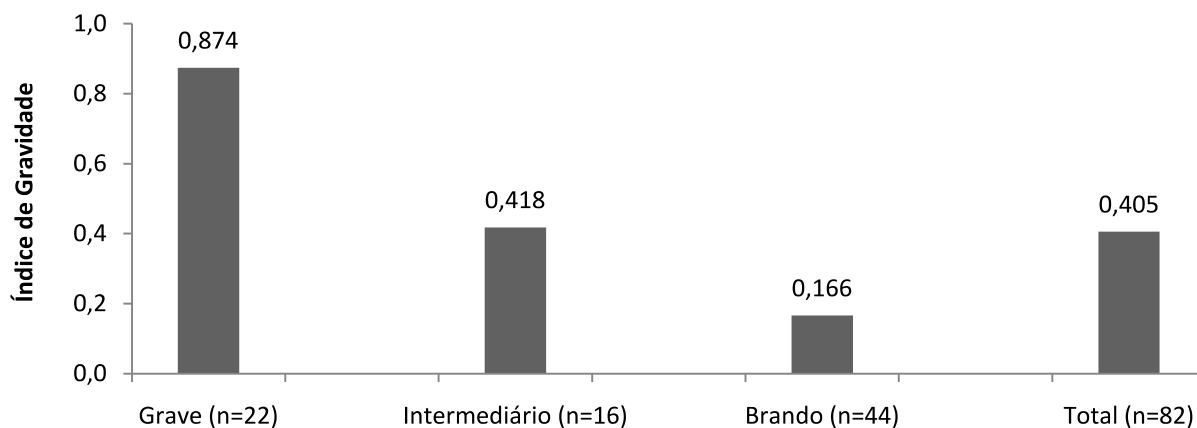


Figura 3. Classificação dos pacientes conforme o índice de gravidade da doença falciforme, sendo considerados pertencentes ao fenótipo mais brando os índices de valor até 0,3, intermediários de 0,3 a 0,6 e graves os valores acima de 0,6.

Do total de indivíduos analisados, 45 apresentaram diagnóstico de retinopatia, dos quais 30 apresentam a forma não-proliferativa e 15 portam a forma proliferativa, enquanto 55 tiveram exame oftalmológico normal (tabela 2).

Tabela 1. Dados dos pacientes avaliados.

	HbSS (n=32)		HbSC (n=39)	
	Idade (desvio padrão)	Gênero (M/F)	Idade (desvio padrão)	Gênero (M/F)
Ausência de retinopatia (n=34)	35,3 (11,0)	4/15	39,8 (6,9)	8/7
Retinopatia não-proliferativa (n=22)	38,8 (12,5)	4/3	39,5 (10,6)	3/12
Retinopatia proliferativa (n=15)	40,0 (6,7)	5/1	46,1 (17,6)	5/4

3.2. Metodologia

3.2.1. Coleta do Plasma

O plasma de pacientes e controles foi separado através de centrifugação a 3.500 RPM por 15 minutos a partir de 4,0 ml de sangue venoso periférico coletado utilizando citrato de sódio a 3,2% ou EDTA como anticoagulantes, seguindo-se o armazenamento imediato a -20°C.

3.2.2. Quantificação de Proteínas Plasmáticas

Os níveis plasmáticos de Ang-1, Ang-2, sICAM-1, sVCAM-1, Selectina-E, Selectina-P e VEGF foram determinados por meio de ensaios imunoenzimáticos (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA), de acordo com os protocolos disponibilizados pelo fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, MN). Após adição das

amostras e padrões na placa a qual o anticorpo monoclonal encontra-se adsorvido, há a incubação e posterior lavagem, para eliminação de ligações inespecíficas. Segue-se, então, a adição de anticorpo de marcação (ELISA tipo sanduíche) e, após lavagem e adição de substrato da enzima à qual o anticorpo está conjugado a solução-substrato passa emitir luminosidade em um dado comprimento de onda (450 nm e 490 nm) em intensidade proporcional à quantidade de antígeno.

3.2.3. Análise genética

Após a extração de DNA a partir de sangue por meio do método fenol-clorofórmio e padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das regiões de interesse, com os *primers* que flanqueando os polimorfismos de base única -790C/T e -358G/A do *PEDF* (*primers* descritos na tabela 2). Os produtos da PCR são a seguir separados por técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e examinados sob luz ultravioleta. Os produtos das PCRs são analisados por sequenciamento automático realizado segundo o método de Sanger *et al* (1975) pelo sistema ABI3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., CA, USA) e lidos pelo programa FinchTV (Geospiza, EUA) usando como referência as sequências depositadas no banco de dados BLAST, pertencente ao servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabela 2. *Primers* diretos e reversos empregados na amplificação das sequências-alvo nos gene *PEDF*, desenhados com os softwares *Primer 3* (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e Gene Runner 3.05 (Hastings Software, Inc.).

Gene/SNP/Orientação	Sequência
PEDF/-790 T/C Direto	5'-TTGAGACAAGCGTGACCAATGT-3'
PEDF/-790 Reverso	5'-TTCCCGTCACCATAACC-3'
PEDF/-358 G/A Direto	5'-CTACAGGTGCGCGCCAAC-3'
PEDF/-358 G/A Reverso	5'-CTAAGGCGCACACATTGCACA-3'

3.2.4. Análise estatística

Os dados obtidos nas quantificações plasmáticas são apresentados por mediana quartil e comparados pelo teste t não-pareado e pelo teste U de Mann-Whitney quando dois grupos são comparados, ou por a ANOVA e teste Kruskal-Wallis, quando mais de dois grupos são avaliados. As correlações foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r). As análises genéticas são interpretadas conforme resultado de Teste exato de Fischer. Software estatístico foi empregado (GraphPad Prism versão 5.04, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) e p-valores $<0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

4.1.1. Concentração plasmática de angiopoietina-1

A concentração plasmática de Ang-1 mostrou diferença estatisticamente significativa entre indivíduos acometidos por doenças falciformes (mediana 1426 pg/mL) e controles saudáveis (mediana 234,5 pg/mL, p-valor = 0,0003, figura 4A). As medianas diferem ainda entre os três genótipos (HbAA, HbSS e HbSC, p-valor = 0,0015, figura 4B), embora o mesmo não ocorra entre os genótipos HbSS e HbSC (medianas 1123 pg/mL e 1426 pg/mL, respectivamente, p-valor = 0,7856).

A estratificação segundo o quadro oftalmológico não revelou diferença entre os grupos, apesar de os pacientes afetados por retinopatia exibirem maior mediana (1567 pg/mL) em relação aos indivíduos sem retinopatia (1226 pg/mL, p-valor = 0,995, figura 4C). A subdivisão do grupo afetado segundo o tipo de retinopatia, igualmente, não indicou diferença entre estes subgrupos, sendo os indivíduos com a forma não-proliferativa os de maior mediana (1623 pg/mL), enquanto o grupo portador da forma proliferativa apresentou a menor (819,5 pg/mL, p-valor = 0,6861, figura 4D).

Pacientes com dados clínicos disponíveis (n = 47) foram estratificados também conforme a gravidade da doença falciforme e tiveram medianas comparadas entre os grupos brando (1528 pg/mL) e grave (1155 pg/mL), não havendo diferença nos níveis de Ang-1 entre estes (p-valor = 0,2225, figura 4E).

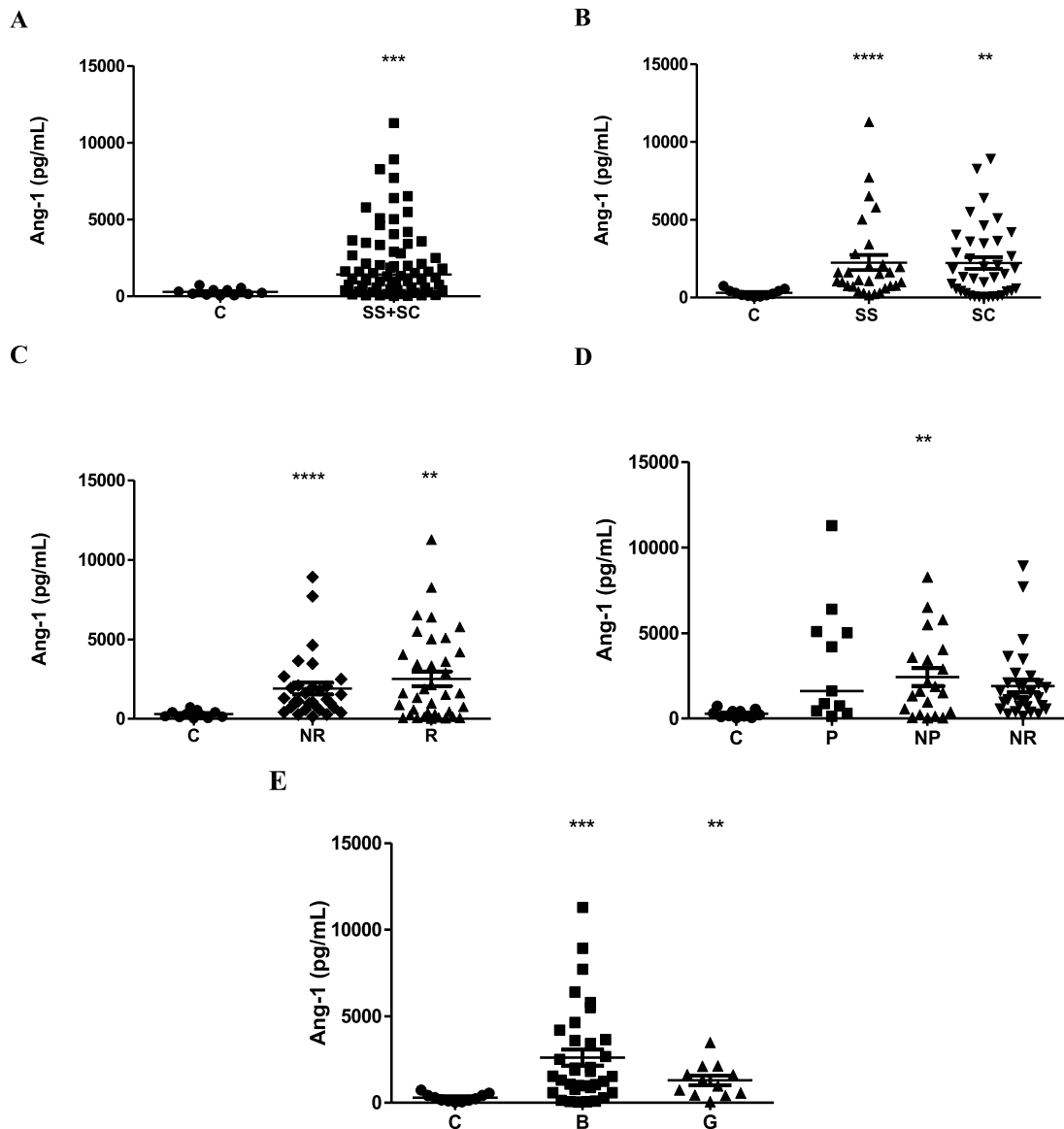


Figura 4. Concentração plasmática de angiopoietina-1 em pg/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11) e portadores de doença falciforme (SS+SC, n = 68) (***) teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0003). **B.** comparação entre indivíduos controle e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 29) e SC (n = 38) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0015. **** C vs. SS, teste de Mann-Whitney, p-valor < 0,0001. ** C vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0045. SC vs. SS, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,7856). **C.** Comparação entre indivíduos controle, sem retinopatia (NR, n = 21) e afetados (R, n = 32) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0016. **** C vs. NR, teste de Mann-Whitney, p-valor < 0,0001. ** C vs. R: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0080. NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,995). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11), acometidos por retinopatia proliferativa (P, n = 14), não-proliferativa (NP, n = 19) e sem retinopatia (NR, n = 21) (Teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0042. C vs. P, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0667. ** C vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0088. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,6861). **E.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 35) e grave (G, n = 12) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0005. *** C vs. B, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0004. ** C vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0015. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,2225).

4.1.2. Concentração plasmática de angiopoietina-2

A concentração plasmática de Ang-2 diferiu entre controles (mediana 1414 pg/mL) e indivíduos com doenças falciformes (mediana 2822 pg/mL, p-valor < 0,0001, figura 5A). Entre estes, pacientes com o genótipo HbSS apresentaram maiores níveis (mediana 4461 pg/mL) em relação aos pacientes HbSC (mediana 2258 pg/mL, p-valor < 0,0001, figura 5B).

Comparando-se os indivíduos segundo presença de retinopatia (mediana 2896 pg/mL) ou ausência (mediana 2679 pg/mL), não foi possível observar diferença entre os grupos (p-valor = 0,5719, figura 5C), do mesmo modo como os tipos de retinopatia não parecem diferir quanto aos níveis de Ang-2 (medianas: não-proliferativa 2713 pg/mL e proliferativa 2642 pg/mL, p-valor = 0,4900, figura 4D).

Os níveis de Ang-2 estão aumentados em indivíduos qualificados como portadores de doença falciforme branda (mediana 1528 pg/mL) em relação aos pacientes da forma grave (mediana 1155 pg/mL), ainda que não de forma estatisticamente significativa (p-valor = 0,3961, figura 5E).

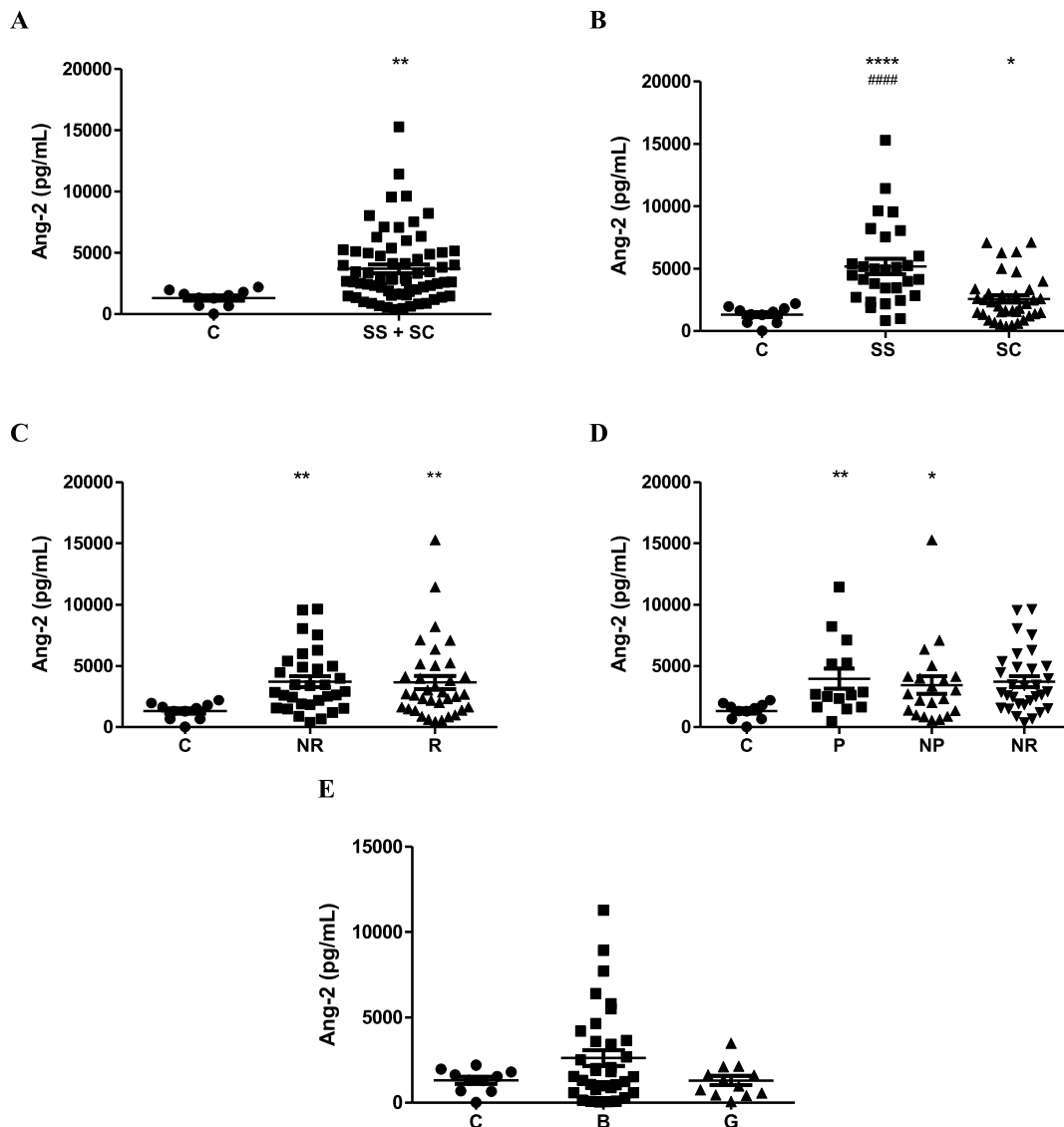


Figura 5. Concentração plasmática de angiopoietina-2 em pg/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10) e portadores de doença falciforme (SS+S, n = 67) (teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0012). **B.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10) e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 29) e SC (n = 38) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor < 0,0001. **** C vs. SS, teste de Mann-Whitney, p-valor < 0,0001. * C vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0290. #### SS vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor < 0,0001). **C.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10), sem retinopatia (NR, n = 21) e afetados (R, n = 32) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0047. ** C vs. NR, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0013. ** C vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0051. NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,5719). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10), acometidos por retinopatia proliferativa (P, n = 14), não-proliferativa (NP, n = 19) e sem retinopatia (NR, n = 21) (Teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0105. ** C vs. P, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0054. * C vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0213. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,4900). **E.** Concentração plasmática de angiopoietina-2 em pg/mL entre indivíduos controle (C, n = 10), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 44) e grave (G, n = 12) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0119. C vs. B, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,3604. C vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,8175. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,3961).

4.1.3. Concentração plasmática de VCAM-1 circulante

Os níveis plasmáticos de sVCAM-1, apesar de aumentados nos portadores de doença falciforme (mediana 512 ng/mL) em relação aos indivíduos controle (mediana 374 ng/mL), não obtiveram êxito em alcançar significância estatística (p-valor = 0,0765, figura 6A). De modo similar, os níveis de sVCAM-1 entre os grupos de diferentes genótipos de β -globina não são distintos, embora pacientes HbSS exibam maior mediana (614 ng/mL) que pacientes HbSC (478 ng/mL) e HbAA (p-valor = 0,1007, figura 6B)

Quanto à análise de acordo com a avaliação oftalmológica, pacientes acometidos por retinopatia exibiram valores aumentados (523 ng/mL) em relação aos não acometidos (mediana 474 ng/mL, p-valor = 0,6524, figura 6C), entretanto não significativamente. Ao se refinar a divisão do grupo afetado com base no estágio de retinopatia, observa-se maiores níveis de sVCAM-1 na retinopatia proliferativa (mediana 547 ng/mL) em relação à forma não-proliferativa (mediana 519 ng/mL), embora não se confirme pelos métodos estatísticos aplicados (p-valor = 0,4854, figura 6D).

A avaliação entre os grupos de pacientes graves (mediana 442 ng/mL) e brandos (mediana 519 ng/mL) mostrou níveis maiores no último, no entanto, tal diferença não atinge significância estatística (p-valor = 0,3721, figura 6E).

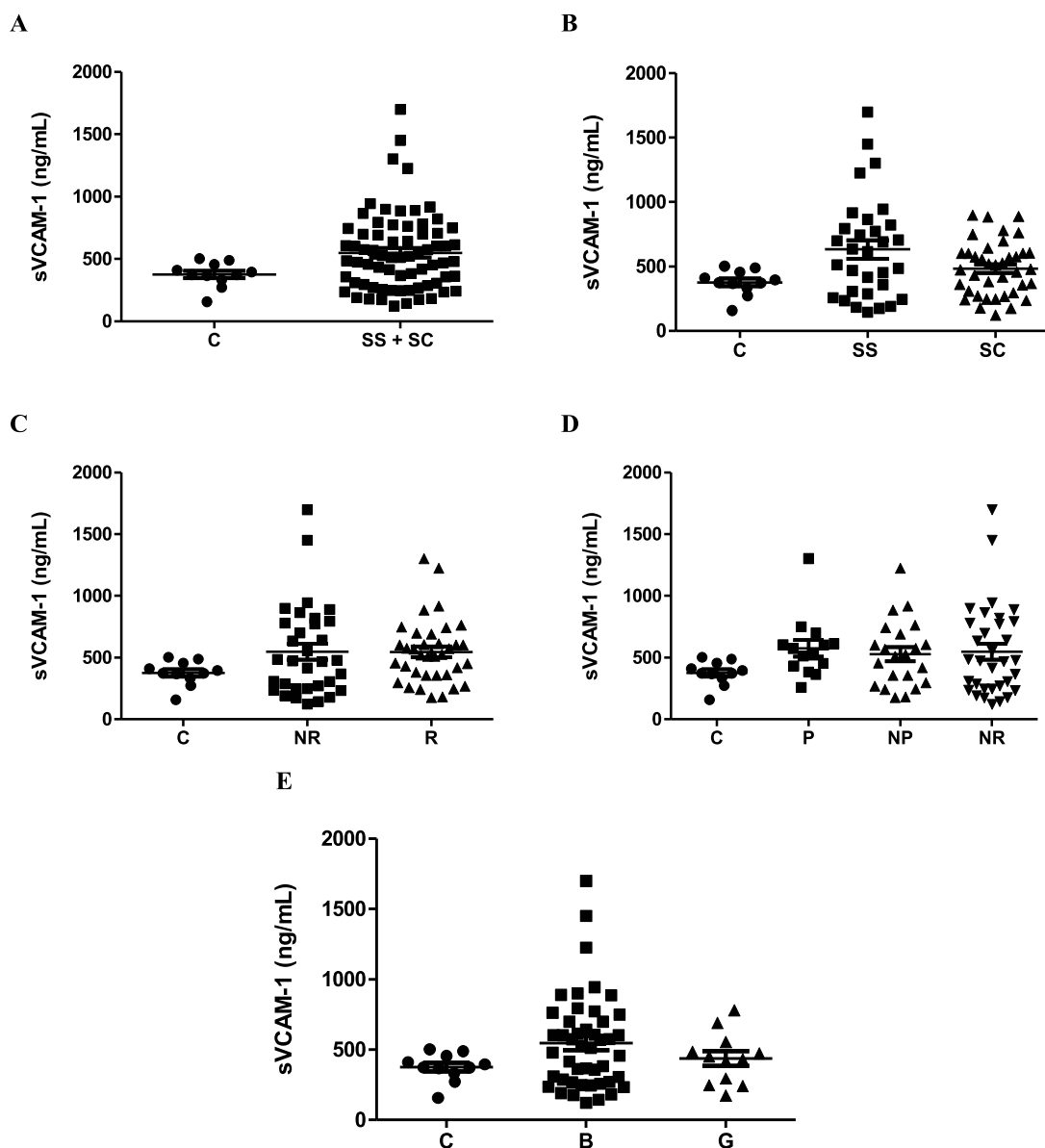


Figura 6. Concentração plasmática de sVCAM-1 em ng/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11) e portadores de doença falciforme (SS+S, n = 70) (teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0765). **B.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11) e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 31) e SC (n = 39) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,1007. SS vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,1934). **C.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11), sem retinopatia (NR, n = 33) e afetados (R, n = 36) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,1829. NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,6524). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11), acometidos por retinopatia proliferativa (n = 14), não-proliferativa (NP, n = 19) e sem retinopatia (NR, n = 33) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,7748. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,4854). **E.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 11), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 35) e grave (G, n = 12) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,2853. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,3721).

4.1.4. Concentração plasmática de ICAM-1 circulante

Os níveis de sICAM-1 apresentaram valores aumentados no grupo portador de doença falciforme (mediana 333 ng/mL) em relação aos controles (mediana 229 ng/mL), embora a diferença não seja validada estatisticamente (p-valor = 0,0917, figura 7A). De modo análogo, não é possível discriminar os três genótipos conforme concentração de sICAM-1 (p-valor = 0,2110), ainda que pacientes HbSC apresentem maiores níveis (mediana 365 ng/mL) em relação a pacientes HbSS (mediana 288 ng/mL, p-valor = 0,0822, figura 7B).

A comparação entre os grupos de pacientes afetados (mediana 288 ng/mL) e não afetados (mediana 368 ng/mL) por retinopatia mostra elevação nos níveis de sICAM-1 no segundo grupo de maneira estatisticamente significativa (p-valor = 0,0459, figura 7C). Com o objetivo de averiguar se essa relação é verdadeira para ambos os genótipos, foi testada a diferença entre indivíduos com e sem retinopatia de genótipo HbSC (medianas afetados e não afetados: 290 ng/mL e 474 ng/mL, respectivamente) e de genótipo HbSS (medianas afetados e não afetados: 242 ng/mL e 333 ng/mL, respectivamente). Tal análise permitiu observar níveis significativamente aumentados em pacientes sem retinopatia no grupo HbSC (p-valor = 0,0121) mas apenas tendência no grupo HbSS (p-valor = 0,2155), em relação a suas contrapartes de mesmo genótipo e presença de retinopatia. Não houve, no entanto, diferença significativa na comparação entre os tipos de retinopatia (proliferativa: mediana 267 ng/mL; não-proliferativa: mediana 289 ng/mL, p-valor = 0,7640, figura 7D).

A análise dos indivíduos dispostos em grupos segundo a gravidade demonstrou tendência de aumento em indivíduos com a forma grave (mediana 422 ng/mL, contra 349 ng/mL nos pacientes com a forma branda, p-valor = 0,3692, figura 7E)

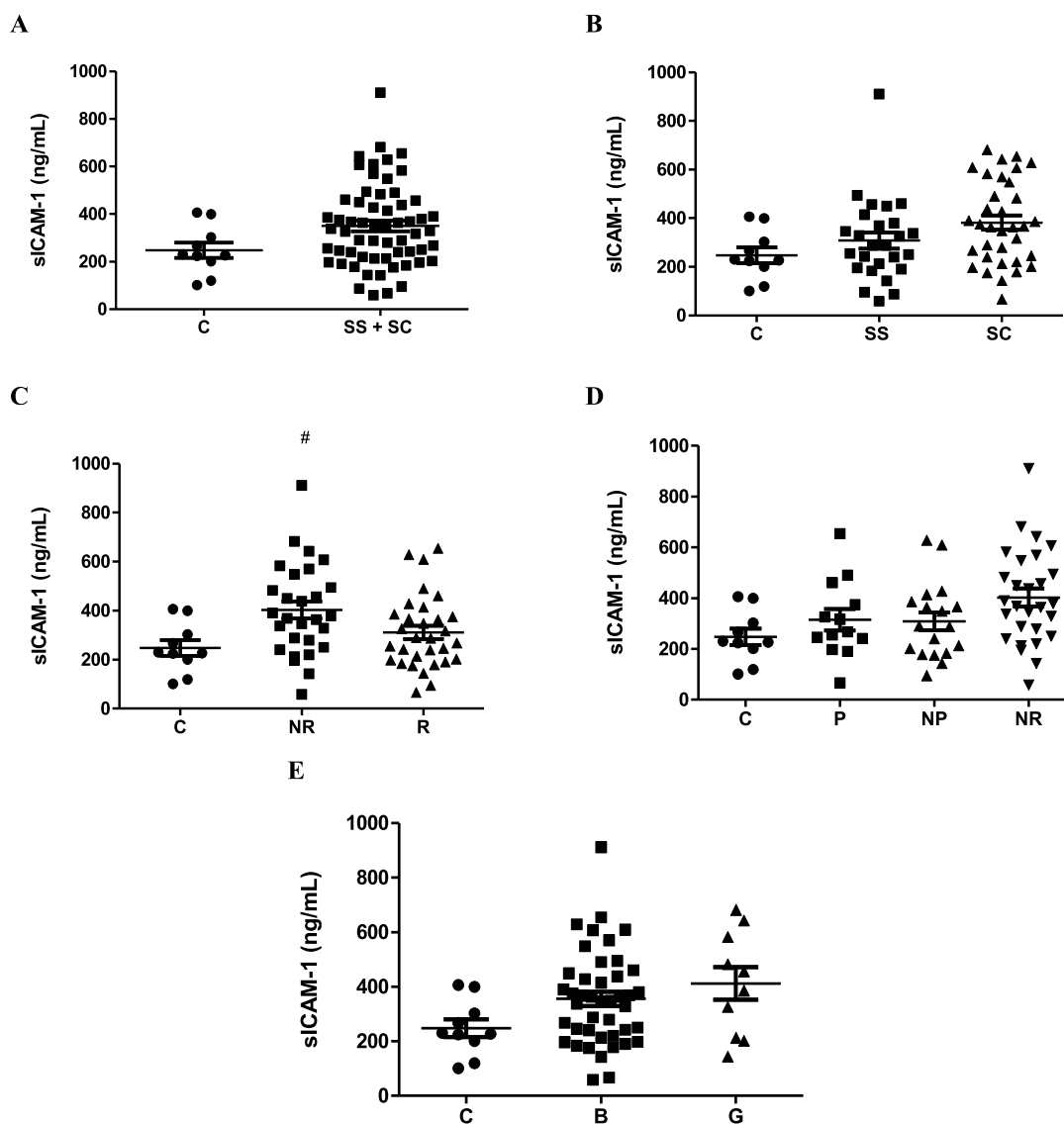


Figura 7. Concentração plasmática de sICAM-1 em ng/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n=10) e portadores de doença falciforme (SS+SC, n = 60) (teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0917). **B.** Comparação entre indivíduos controle (C, n=10) e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 26) e SC (n = 34) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,2110. SS vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0822). **C.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10), sem retinopatia (NR, n=29) e afetados(R, n= 31) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0551. #NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0459). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10), acometidos por retinopatia proliferativa (n=14), não-proliferativa (NP, n = 18) e sem retinopatia (NR, n = 29) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0551. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,7640). **E.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 10), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 43) e grave (G, n = 10) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,1100. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,3692).

4.1.5. Concentração plasmática de Selectina-E circulante

Os níveis de sSelectina-E entre indivíduos controle (mediana 22,5 ng/mL) e portadores de doença falciforme (mediana 26,2 ng/mL) não foram significativamente distintos (p -valor = 0,3113, figura 8A). Da mesma forma se deu na comparação entre os grupos de diferentes genótipos, apesar de mediana levemente maior em pacientes HbSC (mediana 27,4 ng/mL) em relação a pacientes HbSS (mediana 26,0 ng/mL, p -valor = 0,9605, figura 8B).

As concentrações plasmáticas entre os grupos sem diagnóstico de retinopatia (mediana 23,5 ng/mL) e com tal diagnóstico (mediana 32,4 ng/mL) não foram estatisticamente díspares, embora por valor de significância limítrofe (p -valor = 0,0527, figura 8C). Possível distinção parece ser mais provável para o genótipo HbSS (medianas grupo afetado: 35,6 ng/mL e grupo não-afetado: 23,5 ng/mL, p -valor = 0,0636) em relação ao grupo HbSC (medianas grupo afetado: 31,3 ng/mL e grupo não-afetado: 20,7 ng/mL, p -valor = 0,5148). O grupo que desenvolveu retinopatia proliferativa apresentou maior mediana (35,9 ng/mL) em relação ao grupo afetado pela forma não-proliferativa (30,4 ng/mL), embora a tal diferença não seja significativa (p -valor = 0,3950, figura 8D).

Pacientes portando a forma grave (mediana 40,7 ng/mL) de doença falciforme apresentaram mediana maior que pacientes com manifestação branda da doença (mediana 26,0 ng/mL), porém a diferença não se sustenta estatisticamente (p -valor = 0,3396, figura 8E).

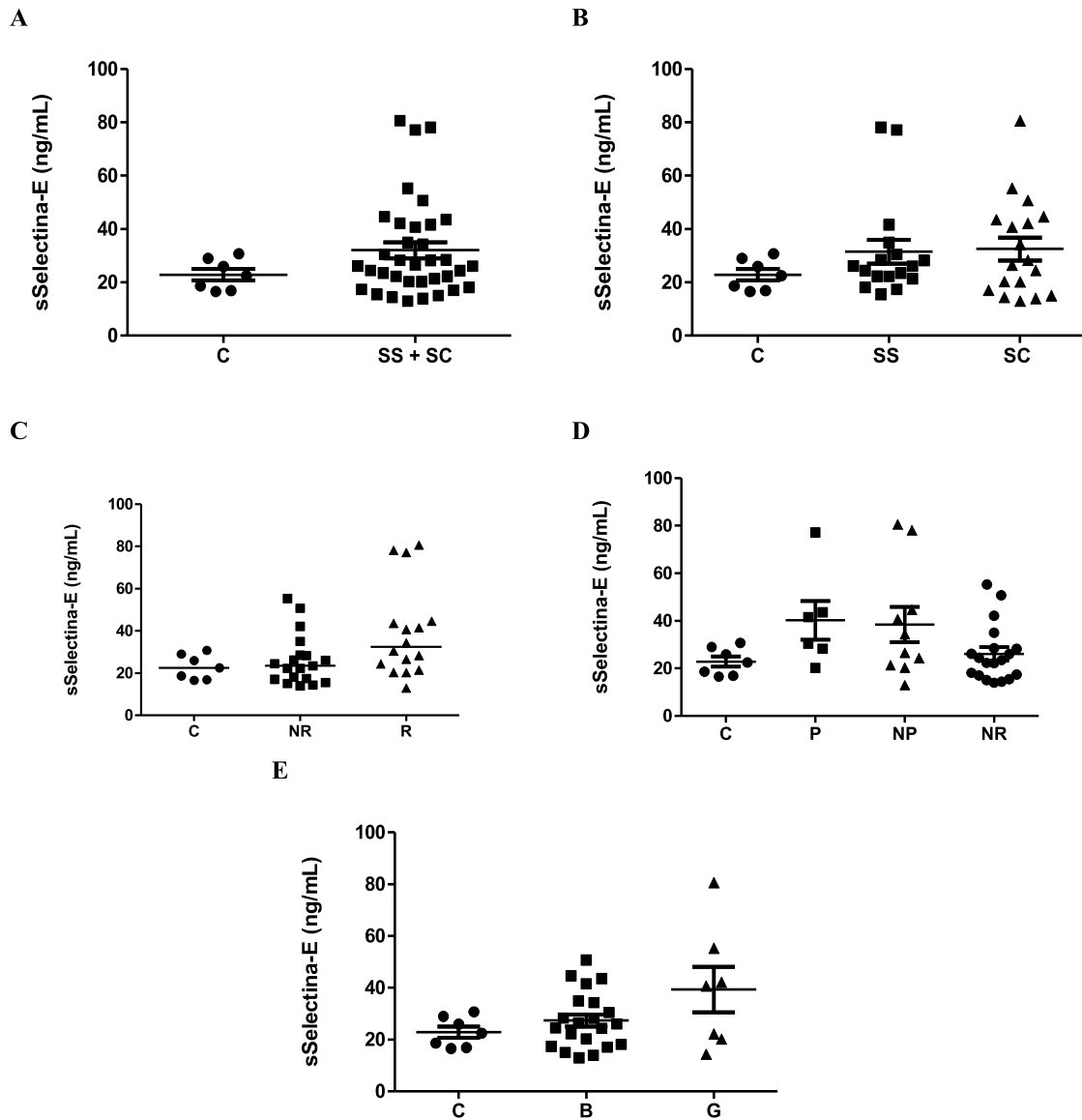


Figura 8 Concentração plasmática de sSelectina-E em ng/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7) e portadores de doença falciforme (SS+S, n = 35) (teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,3113). **B.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7) e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 17) e SC (n = 18) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,5883. SS vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,9605). **C.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7), sem retinopatia (NR, n = 16) e afetados (R, n = 19) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,0723. NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,0527). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7), acometidos por retinopatia proliferativa (P, n = 6), não-proliferativa (NP, n = 10) e sem retinopatia (NR, n = 16) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,1240. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,7925). **E.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 21) e grave (G, n = 7) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,3950. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,3396).

4.1.6. Concentração plasmática de Selectina-P circulante

Não houve diferença estatisticamente perceptível entre indivíduos controle (mediana 33,0 ng/mL) e portadores de doença falciforme (mediana 39,0 ng/mL, p-valor = 0,5915, figura 9A) quanto aos níveis de sSelectina-P. Entre os genótipos, os grupo HbSC e HbSS exibiram concentrações similares (medianas 39,5 ng/mL e 37,0 ng/mL, p-valor = 0,9490, figura 9B).

A classificação dos indivíduos segundo ocorrência de retinopatia indica níveis moderadamente aumentados de sSelectina-P no grupo não afetado (mediana 39,7 ng/mL) em comparação ao grupo afetado (mediana 30,6 ng/mL, p-valor = 0,8920, figura 9C). Contudo, o grupo acometido pela forma proliferativa exibiu os maiores níveis plasmáticos de sSelectina-P (mediana 43,9 ng/mL), enquanto o grupo em estágio não-proliferativo mostrou os menores valores (mediana 25,8 ng/mL, p-valor = 0,5353, figura 9D).

Da mesma forma que nas comparações anteriores para sSelectina-P, a análise segundo o cálculo de gravidade não obteve êxito em alcançar significância estatística. O grupo classificado como grave, entretanto, exibiu valores aumentados (mediana 40,7 ng/mL) em relação ao grupo de manifestação branda (mediana 26,0 ng/mL, p-valor = 0,5074, figura 9E).

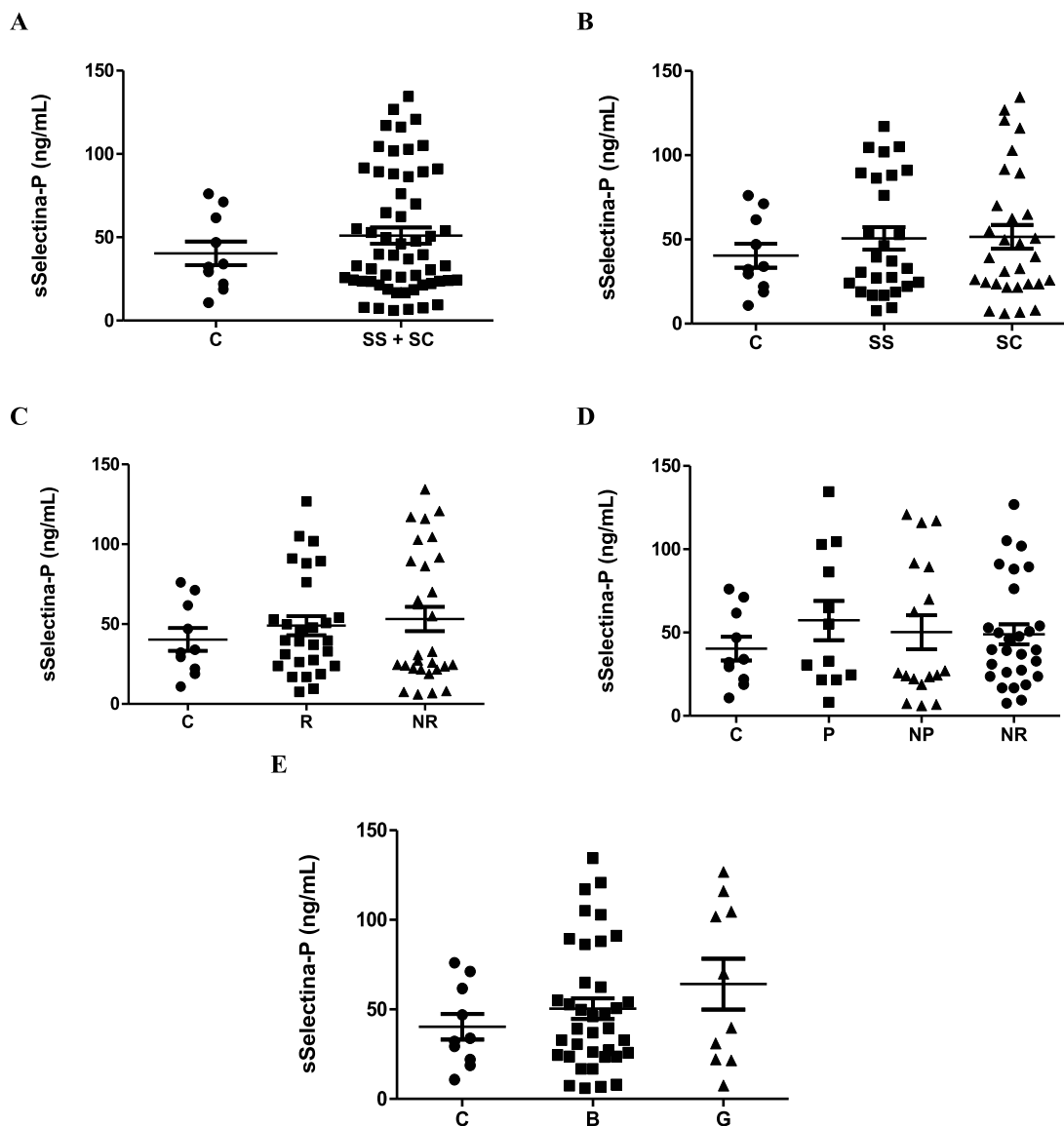


Figura 9 Concentração plasmática de sSelectina-P em ng/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 9) e portadores de doença falciforme (SS+S, n = 58) (teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,5915). **B.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 9) e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 31) e SC (n = 39) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,8610. SS vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,9490). **C.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 9), sem retinopatia (NR, n = 28) e afetados (R, n = 29) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,8489 NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,8920). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 9), acometidos por retinopatia proliferativa (n = 12), não-proliferativa (NP, n = 17) e sem retinopatia (NR, n = 28) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,7634. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,5353). **E.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 9), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 37) e grave (G, n = 10) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,5917. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,5074).

4.1.7. Concentração plasmática de VEGF

Os níveis plasmáticos de VEGF atingiram valores maiores no grupo portador de doença falciforme (mediana 109,3 pg/mL) frente ao grupo controle (mediana 64,7 pg/mL, p-valor = 0,2288, figura 10A). Entre indivíduos com a condição falciforme, o grupo de genótipo HbSC superou o grupo HbSS quanto aos níveis desta molécula (medianas 140,1 pg/mL e 95,2 pg/mL, respectivamente; p-valor = 0,5355, figura 10B).

Os indivíduos agrupados pela presença de retinopatia demonstraram concentrações plasmáticas de VEGF superiores (mediana 151,3 pg/mL) às daquelas do grupo não afetado (mediana 72,0 pg/mL, p-valor = 0,2772, figura 10C). Entretanto, o grupo afetado pela forma proliferativa exibiu níveis menores (mediana 83,7 pg/mL) deste fator angiogênico que o grupo em estágios iniciais de desenvolvimento de retinopatia (mediana 169 pg/mL, p-valor = 0,4273, figura 10D).

A análise da concentração de VEGF nos indivíduos de acordo com o perfil de gravidade da doença falciforme mostrou níveis mais pronunciados nos indivíduos do grupo brando (93,8 pg/mL) em relação aos indivíduos caracterizados como de manifestação grave (46,4 pg/mL, p-valor = 0,6608).

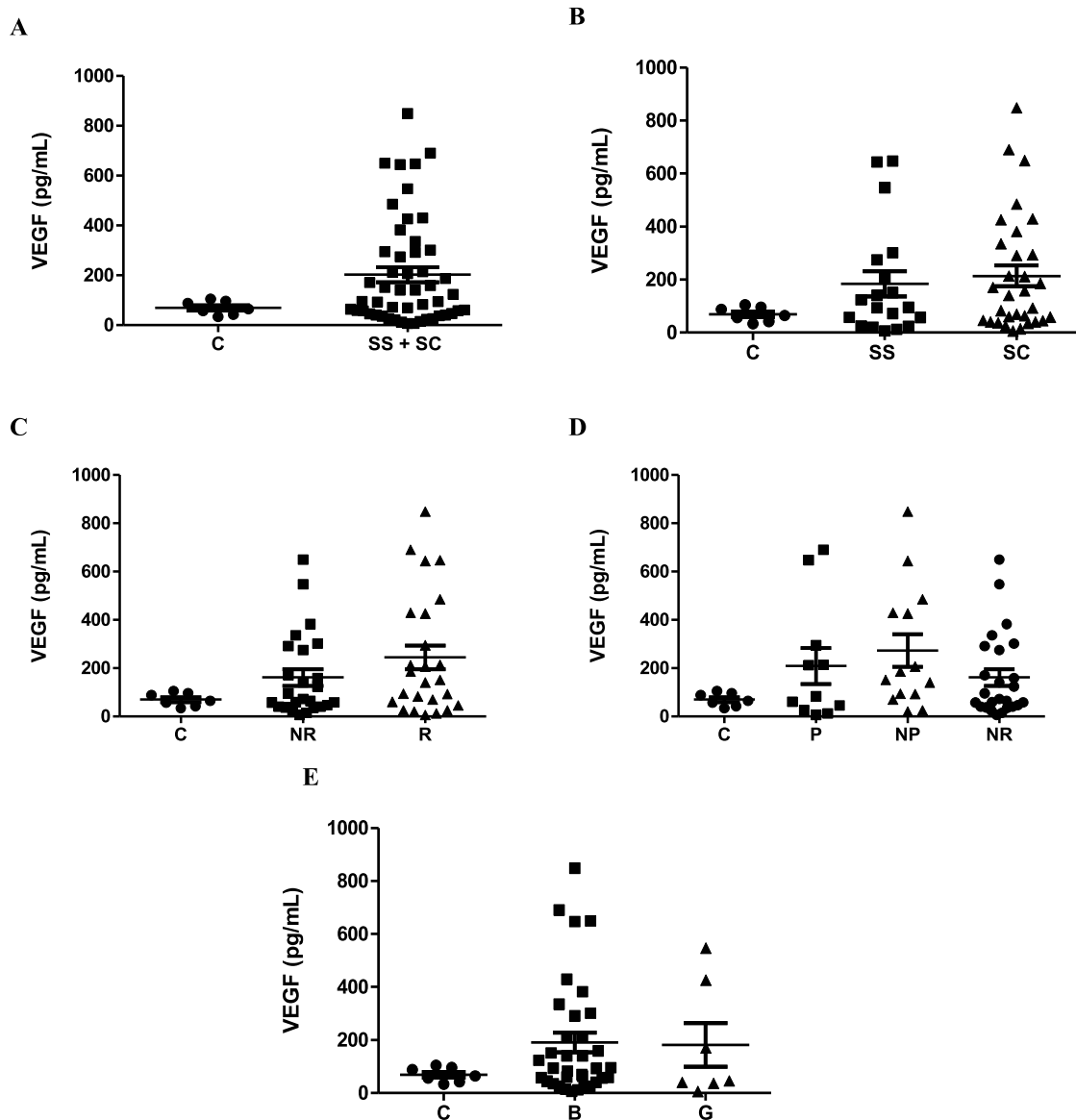


Figura 10. Concentração plasmática de VEGF em pg/mL. **A.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7) e portadores de doença falciforme (SS+S, n = 57) (teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,2288). **B.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7) e portadores de doença falciforme com genótipos SS (n = 19) e SC (n = 31) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,3997. SS vs. SC: teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,5355). **C.** Concentração plasmática de VEGF em pg/mL entre indivíduos controle (C, n = 7), sem retinopatia (NR, n = 25) e afetados (R, n = 25) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,2586. NR vs. R, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,2772). **D.** Comparação entre indivíduos controle (C, n = 7), acometidos por retinopatia proliferativa (P, n = 11), não-proliferativa (NP, n = 14) e sem retinopatia (NR, n = 25) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,3309. P vs. NP, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,4273). **E.** Concentração plasmática de VEGF em pg/mL entre indivíduos controle (C, n = 7), indivíduos com doença falciforme na forma branda (B, n = 35) e grave (G, n = 7) (teste de Kruskal-Wallis entre medianas, p-valor = 0,5717. B vs. G, teste de Mann-Whitney, p-valor = 0,6608).

4.2. Correlações entre dosagens plasmáticas e dados clínicos

As correlações realizadas entre parâmetros clínicos e os níveis plasmáticos de Ang-1, Ang-2, sVCAM-1, sICAM-1, sSselectina-E, sSelectina-P e VEGF podem ser observadas em detalhes na tabela 3.

Os níveis de Ang-2 exibiram correlação significativa com o hematócrito de pacientes de ambos os genótipos (HbSC: $r = -0,719$, $p < 0,001$; HBSS: $r = -0,438$, $p = 0,046$), enquanto a sSelectina-E foi correlacionada à presença de retinopatia apenas no grupo HbSS ($r = 0,576$, $p = 0,016$).

O restante das correlações significativas foram observadas em pacientes HbSC, nos quais os níveis de sICAM-1 foram significativamente correlacionados tanto com retinopatia ($r = -0,458$, $p = 0,006$) quanto com a contagem de reticulócitos ($r = 0,604$, $p = 0,001$). Foi possível detectar ainda correlação entre a concentração plasmática de sVCAM-1 e níveis de hemoglobina total ($r = 0,404$, $p = 0,024$) e entre a quantificação de VEGF e contagem de eritrócitos ($r = 0,656$, $p < 0,001$).

Tabela 3. Correlações de biomarcadores plasmáticos e parâmetros clínicos em pacientes HbSS e HbSC.

	Retinopatia	Hb	Hematócrito	Eritrócitos	Cont. reticulócito
<i>HbSS (n =32)</i>					
Ang-1	0,341, 0,070	-0,274, 0,229	-0,170, 0,462	-0,145, 0,531	-0,050, 0,838
Ang-2	0,045, 0,815	-0,379, 0,090	-0,438, 0,046*	0,183, 0,427	0,415, 0,077
sVCAM-1	-0,002, 0,992	-0,340, 0,121	-0,361, 0,098	-0,180, 0,423	0,107, 0,652
sICAM-1	-0,309, 0,117	-0,113, 0,625	-0,095, 0,680	-0,091, 0,695	0,126, 0,607
sSelectina-E	0,576, 0,016*	-0,431, 0,213	-0,421, 0,225	-0,107, 0,769	-0,063, 0,863
sSelectina-P	-0,040, 0,844	-0,046, 0,848	-0,049, 0,839	0,300, 0,199	0,029, 0,905
VEGF	0,172, 0,483	-0,202, 0,487	-0,163, 0,577	-0,225, 0,439	0,295, 0,351
<i>HbSC (n =39)</i>					
Ang-1	-0,053, 0,749	-0,130, 0,485	-0,300, 0,094	-0,114, 0,532	0,054, 0,787
Ang-2	0,120, 0,474	-0,201, 0,286	-0,719, < 0,001*	-0,166, 0,371	0,192, 0,347
sVCAM-1	0,143, 0,384	0,404, 0,024*	0,186, 0,308	0,237, 0,191	-0,107, 0,595
sICAM-1	-0,458, 0,006*	-0,172, 0,38	-0,213, 0,266	-0,247, 0,197	0,604, 0,001*
sSelectina-E	0,171, 0,497	-0,154, 0,583	-0,435, 0,0921	-0,188, 0,486	-0,071, 0,810
sSelectina-P	0,191, 0,303	-0,015, 0,944	-0,255, 0,208	0,378, 0,056	0,295, 0,182
VEGF	0,253, 0,163	-0,197, 0,344	-0,195, 0,33893	0,656, < 0,001*	-0,109, 0,628

Dados apresentados como coeficiente de correlação de Pearson (r), seguidos de p-valores. * Valores de p <0,05.

4.3. Análise genética

Realizou-se o sequenciamento e análise de 100 indivíduos (40 HbSC e 60 HbSS) quanto ao genótipo para a região do SNP (rs12948385) no promotor do gene *PEDF*. Dentre estes 100, 45 são afetados por retinopatia falciforme (26 HbSC e 19 HbSS), enquanto os 55 restantes apresentam exame de fundo de olho normal (14 HbSC e 41 HbSS, tabelas 5 e 6).

Ainda na região promotora do gene *PEDF*, na região do polimorfismo -790T/C, (rs12150053) foram analisadas as sequências de 92 indivíduos (32 HbSC e 60 HbSS), dos quais 36 possuem diagnóstico de retinopatia (18 HbSC e 18 HbSS) e 56 não apresentam alterações retinianas (14 HbSC e 41 HbSS tabelas 5 e 7).

Não foi possível detectar associação significativa entre os pacientes agrupados por manifestação ocular e as frequências dos polimorfismos na região promotora do gene *PEDF* (tabelas 6 e 7).

Tabela 4. Genótipos dos polimorfismos-358G/A (rs12948385) e -790T/C (rs12150053) no gene *PEDF* nos diferentes grupos estudados.

	Afetados		Não-afetados	
	SC	SS	SC	SS
<i>rs12948385</i>				
GG	19	15	12	33
GA	7	4	2	7
AA	0	0	0	1
<i>rs12150053</i>				
TT	14	15	11	32
TC	4	3	3	9
CC	0	0	0	1

Tabela 5. Proporções dos genótipos do polimorfismo -358G/A (rs12948385).

	Afetados	Não-afetados	Total
GG	34 (34%)	45 (45%)	79 (79%)
GA	11 (11%)	9 (9%)	20 (20%)
AA	0	1 (1%)	1 (1%)
Total	45 (45%)	55 (55%)	100 (100%)

Teste exato de Fischer; p-valor = 0,4694.

Tabela 6. Proporções dos genótipos do polimorfismo -790T/C (rs12150053).

	Afetados	Não-afetados	Total
TT	29 (32%)	43 (47%)	72 (78%)
TC	7 (8%)	12 (13%)	19 (21%)
CC	0	1 (1%)	1 (1%)
Total	36 (39%)	56 (61%)	92 (100%)

Teste exato de Fischer, p-valor = 0,7976.

DISCUSSÃO

As doenças falciformes se manifestam em um estado de inflamação sistêmica (HAQUE *et al.*, 2002), de modo que os pacientes são caracterizados por episódios recorrentes de vaso-occlusão (MOUSA *et al.*, 2010). Estes, frequentemente, conduzem a dano tecidual por isquemia e reperfusão (MAY *et al.*, 2010).

A fisiopatologia das doenças falciformes exhibe caráter cíclico e há numerosos fatores que contribuem para a variabilidade fenotípica, especialmente os que colaboram para a retenção de eritrócitos e leucócitos nos leitos capilares e agravamento da estase (HEBBEL *et al.*, 2009), dado que o tempo de polimerização de HbS supera o tempo de trânsito na microvasculatura pós-capilar (HOFRICHTER *et al.*, 1974). As moléculas comprometidas na resposta inflamatória e, portanto, no aumento na adesão de diferentes tipos celulares ao endotélio vascular (BURNS *et al.*, 1999; HEBBEL, 1997; KAUL *et al.*, 1989) são fatores essenciais para a compreensão dos mecanismos subjacentes à evolução do quadro clínico destes pacientes.

Os níveis aumentados de proteínas de resposta inflamatória e angiogênese em pacientes das doenças falciformes são condizentes com a literatura (KUNZ *et al.*, 2002) e reforçam o consenso que cerca o tema. A causa precisa de formação de novos vasos sanguíneos na fisiopatologia da retinopatia falciforme não é plenamente compreendida, bem como o porquê de sua maior prevalência em indivíduos HbSC, de modo que as manifestações retinianas nestas hemoglobinopatias fornecem um modelo único no estudo da proliferação vascular.

O aumento de angiopoietinas nas doenças falciformes em relação aos controles já havia sido previamente relatado, da mesma forma que angiopoietina-2 encontra-se elevada no genótipo HbSS em relação a HbSC (BLANN, A. D. *et al.*, 2003; MOHAN *et al.*, 2005). Tais relações são concordantes com o pronunciado dano tecidual por hipóxia, reperfusão e infecções recorrentes

em virtude de alta frequência de asplenia nestes pacientes (NUZZO & FONSECA, 2004). A expressão de fatores angiogênicos, em especial VEGF, FGF, angiopoietinas e seus receptores (VANNAY *et al.*, 2005) encontra-se aumentada com o intuito de restabelecer o fluxo em regiões isquêmicas e regenerar os tecidos vasculares (STEINBERG *et al.*, 1984).

Mathews e colaboradores (MATHEWS *et al.*, 2002) descreveram intensa imunorreatividade contra ICAM-1, VCAM-1 e Selectina-P em retinas de indivíduos com doenças falciformes em relação a controles saudáveis. O presente trabalho mostra níveis aumentados de sICAM-1 em indivíduos sem retinopatia quando comparados aos pacientes portadores desta afecção ocular. É feita ainda a distinção entre genótipos HbSS e HbSC para essa relação, a qual aparenta se sustentar neste último genótipo, porém para o primeiro grupo há tendência não confirmada pela técnica estatística empregada.

Possivelmente a relação encontrada entre aumento de ICAM-1 circulante e ausência de retinopatia se dê pela função desta molécula na migração e ativação leucocitária (LADWIN; KATO, 2005), sendo um marcador de ativação endotelial, aumentando a estase no fluxo e precipitando a vaso-oclusão. Esta se daria em maior intensidade na microvasculatura ocular de indivíduos de genótipo HbSC, dado que sua contagem de reticulócito é maior, e essa população participa ativamente na obstrução. Nestes indivíduos, portanto, a ativação endotelial pode agir em conjunto com o número aumentado de reticulócitos e maior viscosidade sanguínea para agravar contundentemente a vaso-oclusão na retina periférica e acelerar o processo de auto-infarto de vasos prematuros com potencial de desenvolver estruturas típicas de retinopatia. Em apoio a esta hipótese, há evidências de que a ICAM-1 esteja envolvida com a regressão espontânea de formações neovasculares na retinopatia diabética (MCLEOD *et al.*, 1995).

Os níveis de sE-selectina exibiram correlação com a presença de retinopatia em HbSS, embora não alcançassem significância ao se testar a diferença entre os grupos de indivíduos

afetados e não-afetados dos dois genótipos. A comparação entre indivíduos de genótipo HbSS mostra tendência a níveis elevados de sE-selectina em acometidos por retinopatia e parece ser responsável pela proximidade ao limiar de significância observada. Uma vez que este genótipo exibe menor hematócrito e contagem de reticulócitos que HbSC, a expressão aumentada de tal fator de adesão ao endotélio pode favorecer um ambiente isquêmico sem promover auto-infarto de neovascularizações e portanto com contínua produção de fatores angiogênicos em resposta à hipóxia e ao dano tecidual pela ativação de granulócitos estimulada por essa molécula (HENSON; JOHNSTON, 1987). Tal panorama é capaz de conduzir o desenvolvimento de retinopatia, apesar desta complicação ser menos frequente no genótipo HbSS.

Importante indutor de crescimento vascular, o VEGF, apesar de aumentado em indivíduos falciformes, não se mostrou estatisticamente relacionado com nenhum grupo aqui avaliado. Do mesmo modo, a avaliação de variantes no promotor do gene *PEDF* não permitiu determinar possível envolvimento destas alterações e a condição oftalmológica. Os achados não excluem a possibilidade de participação destes fatores na retinopatia, já que a análise do VEGF se deu a partir de amostras de sangue periférico, não fielmente representativo do micro-ambiente ocular, e a avaliação genética foi limitada pelo baixo número de indivíduos acometidos, uma vez que a retinopatia atinge principalmente pacientes HbSC, genótipo menos frequente que HbSS e, em geral, com menor acompanhamento clínico (CLARKSON, 1992).

O PEDF encontrou-se implicado em estruturas neovasculares na retinopatia falciforme (KIM *et al.*, 2003), bem como se encontra aumentado no plasma de indivíduos afetados por retinopatia diabética, especialmente em portadores da forma proliferativa (OGATA *et al.*, 2007). Dois polimorfismos pontuais no promotor do gene PEDF, distando 790 e 358 pares de base a montante do ponto de início da tradução, foram considerados fatores de risco para a retinopatia diabética tanto na forma homozigoto quanto heterozigota em uma coorte de 416 indivíduos japoneses não-aparentados (IIZUKA *et al.*, 2007). Este e outros estudos de associação envolvem,

de modo geral, amplitude amostral de algumas centenas de indivíduos, a depender da frequência e importância do marcador para o fenótipo estudado (BALDING, 2006).

Uma vez que o presente estudo envolveu ao todo 100 indivíduos na análise genética, há pouca margem para a interpretação dos resultados, embora a princípio a distribuição de frequências entre os grupos afetado e não-afetado seja aproximadamente uniforme. Tal tendência pode tanto refletir uma flutuação estatística não-representativa da real relação genótipo-fenótipo quanto indicar relação muito fraca ou inexistente entre os marcadores eleitos e a presença de retinopatia falciforme. Neste caso, a base genética da retinopatia falciforme na população estudada seria distinta da apresentada na retinopatia diabética, apesar do gene em questão expressar um fator envolvido em ambas as afecções proliferativas.

CONCLUSÕES

1. O presente trabalho mostrou diferença significativa entre controles e pacientes quanto aos níveis de Ang-1 e Ang-2 (este difere ainda entre HbSS e HbSC), porém os níveis de sVCAM-1, sICAM-1, sSelectina-E, sSelectina-P e VEGF não foram significativamente distintos entre os genótipos avaliados.
2. A concentração de sICAM-1 mostrou níveis elevados em indivíduos HbSC sem retinopatia, mas os níveis de Ang-1, Ang-2, sVCAM-1, sSelectina-E, sSelectina-P e VEGF não se sobressaíram entre não-afetados e afetados ou entre as formas da retinopatia.
3. Nenhum biomarcador esteve alterado entre grupos classificados como indivíduos com a forma branda ou grave da doença de base.
4. Ang-2 exibe correlação inversa com hematócrito tanto em HbSS quanto em HbSC, sSelectina-E encontra-se correlacionada positivamente com retinopatia apenas em HbSS e sICAM-1 encontra-se correlacionado negativamente com retinopatia e positivamente à contagem de reticulócitos apenas em HbSC.
5. Em HbSC observou-se ainda correlações positivas entre hemoglobina e sVCAM-1 e entre VEGF e contagem de eritrócitos.
6. Não houve indicação de influência dos polimorfismos -358G/A e -790T/C no promotor do gene *PEDF* para o grupo avaliado em relação à retinopatia falciforme.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKILE, A. D. Historical and anthropological correlates of beta S haplotypes and alpha- and beta-thalassemia alleles in the Arabian Peninsula. **Hemoglobin**, v. 21, n. 3, p. 281-296, 1997.

AWATA, T.; INOUE, K.; KURIHARA, S. *et al.* A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1635-1639, 2002.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781-91, out 2006.

BALDUS, S.; EISERICH, J. P.; BRENNAN, M.-L. *et al.* Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 7, p. 1010, 2002.

BANDEIRA, D. M.; SILVA, M. A. E. Alterações oculares nas doenças falciformes. **Management**, v. 29, n. 3, p. 285-287, 2007.

BANDEIRA, F. M. G. C.; LEAL, M. C.; SOUZA, R. R. *et al.* Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina “ S ” detectados através de triagem em sangue de cordão umbilical Hemoglobin “ S ” positive newborn detected by cord blood and its characteristics. **Jornal de Pediatria**, v. 75, p. 167-171, 1999.

BILLETT, H. H.; KIM, K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. The percentage of dense red cells does not predict incidence of sickle cell painful crisis. **Blood**, v. 68, n. 1, p. 301-303, 1986.

BLANN, A. D.; MARWAH, S.; SERJEANT, G.; BAREFORD, DAVID; WRIGHT, J. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. **Blood coagulation fibrinolysis an international journal in haemostasis and thrombosis**, v. 14, n. 3, p. 255-259, 2003.

BONANOMI, M. T.; CUNHA, S. L.; ARAÚJO, J. T. DE. Funduscopy alterations in SS and SC hemoglobinopathies. Study of a Brazilian population. **Ophthalmologica Journal international dophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde**, v. 197, n. 1, p. 26-33, 1988.

BRUGNARA, CARLO. Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. **Journal of pediatric hematologyoncology official journal of the American Society of Pediatric HematologyOncology**, v. 25, n. 12, p. 927-933, 2003.

BRUGNARA, C; HA, T. VAN; TOSTESON, D. C. Acid pH induces formation of dense cells in sickle erythrocytes. **Blood**, v. 74, n. 1, p. 487-495, 1989.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762-769, 1997.

BURNS, A. R.; BOWDEN, R. A.; ABE, Y. *et al.* P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. March, p. 299-306, 1999.

CAO, J.; MATHEWS, M. K.; MCLEOD, D. S. *et al.* Angiogenic factors in human proliferative sickle cell retinopathy. **The British journal of ophthalmology**, v. 83, n. 7, p. 838-46, jul 1999.

CAVALLISFORZA, L. L. Citation Classic - the Genetics of Human-Populations. **Current ContentsLife Sciences**, n. 18, p. 17, 1981.

CHATTERJEE, R.; WALDER, R. Y.; ARNONE, A.; WALDER, J. A. Mechanism for the increase in solubility of deoxyhemoglobin S due to cross-linking the beta chains between lysine-82 beta 1 and lysine-82 beta 2. **Biochemistry**, v. 21, n. 23, p. 5901-9, 9 nov 1982.

CHURCHILL, A. J.; CARTER, J. G.; RAMSDEN, C. *et al.* VEGF polymorphisms are associated with severity of diabetic retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 49, n. 8, p. 3611-6, ago 2008.

CLARKSON, J. G. The ocular manifestations of sickle-cell disease: a prevalence and natural history study. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 90, p. 481-504, 1992.

DOWNES, S. M.; HAMBLETON, I. R.; CHUANG, E. L. *et al.* Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. **Ophthalmology**, v. 112, n. 11, p. 1869-1875, 2005.

DRISS, A., ASARE, K.O. J.M. HIBBERT¹, B.E. GEE², T.V. ADAMKIEWICZ³, AND J. K. S. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 5, p. 629, jul 2008.

EATON, W A; HOFRICHTER, J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. **Blood**, v. 70, n. 5, p. 1245-1266, 1987.

EATON, W. A; HOFRICHTER, J. The biophysics of sickle cell hydroxyurea therapy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5214, p. 1142-3, 26 maio 1995.

EMBURY, S. H. The Interaction of Coexistent α -Thalassemia and Sickle Cell Anemia: A Model for the Clinical and Cellular Results of Diminished Polymerization? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 445, n. 1 Fifth Cooley', p. 37-44, jun 1985.

FABRY, M. E.; MEARS, J. G.; PATEL, P. *et al.* Dense cells in sickle cell anemia: the effects of gene interaction. **Blood**, v. 64, n. 5, p. 1042-1046, 1984.

G R SERJEANT, B E SERJEANT, P. F. M. The irreversibly sickled cell; a determinant of haemolysis in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 17, n. 6, p. 527-533, 1969.

GOLDBERG, M. F. Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. **American Journal of Ophthalmology**, v. 71, n. 3, p. 649-665, 1971.

HAINES, J. L.; SCHNETZ-BOUTAUD, N.; SCHMIDT, S. *et al.* Functional Candidate Genes in

Age-Related Macular Degeneration : Significant Association with VEGF. **Investigative Ophthalmology**, v. 47, n. 1, 2006.

HAQUE, A. K.; GOKHALE, S.; RAMPY, B. A. *et al.* Pulmonary hypertension in sickle cell hemoglobinopathy: a clinicopathologic study of 20 cases. **Human Pathology**, v. 33, n. 10, p. 1037-1043, 2002.

HEBBEL, R P. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 11, p. 2561-4, 1 jun 1997.

HEBBEL, R P; MILLER, W. J. Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. **Blood**, v. 64, n. 3, p. 733-741, 1984.

HEBBEL, ROBERT P; OSAROIGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation New York NY** 1994, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004.

HEBBEL, ROBERT P; VERCELLOTTI, G.; NATH, K. A.; ROBERT P. HEBBEL, GREG M. VERCELLOTTI, AND K. A. N. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. **Cardiovascular hematological disorders drug targets**, v. 9, n. 4, p. 271-292, 2009.

HENSON, P. M.; JOHNSTON, R. B. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. **Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 3, p. 669-674, 1987.

HERRICK, J. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, v. 15, p. 490-493, 1910.

HOFRICHTER, JAMES; ROSS, P. D.; EATON, WILLIAM A. Kinetics and Mechanism of Deoxyhemoglobin S Gelation: A New Approach to Understanding Sickle Cell Disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 12, p. 4864-4868, 1974.

HORIUCHI, K.; OSTERHOUT, M. L.; KAMMA, H.; BEKOE, N. A.; HIROKAWA, K. J. Estimation of fetal hemoglobin levels in individual red cells via fluorescence image cytometry. **Cytometry**, v. 20, n. 3, p. 261-267, 1995.

HOUSTON, M.; ESTEVEZ, A.; CHUMLEY, P. *et al.* Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4985-4994, 1999.

IIZUKA, H.; AWATA, T.; OSAKI, M. *et al.* Promoter polymorphisms of the pigment epithelium-derived factor gene are associated with diabetic retinopathy. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 361, n. 2, p. 421-6, 21 set 2007.

INGRAM, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. **Nature**, v. 178, n. 4537, p. 792-794, 1956.

JOINER, C. H. Cation transport and volume regulation in sickle red blood cells. **American**

Journal of Physiology, v. 264, n. 2 Pt 1, p. C251-C270, 1993.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, MARTIN H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood reviews**, v. 21, n. 1, p. 37-47, jan 2007.

KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. Vaso-occlusion by sickle cells: evidence for selective trapping of dense red cells. **Blood**, v. 68, n. 5, p. 1162-1166, 1986.

KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 9, p. 3356-60, maio 1989.

KAUL, D. K.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. **Blood Reviews**, v. 10, n. 1, p. 29-44, 1996.

KIM, S. Y.; MOCANU, C.; MCLEOD, D. S. S. *et al.* Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 4, p. 433-445, out 2003.

KIM, S. Y.; MOCANU, C.; MCLEOD, D. S. *et al.* Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 4, p. 433-445, out 2003.

KUNZ MATHEWS, M.; MCLEOD, D. S.; MERGES, C; CAO, J.; LUTTY, G A. Neutrophils and leucocyte adhesion molecules in sickle cell retinopathy. **The British journal of ophthalmology**, v. 86, n. 6, p. 684-90, jun 2002.

LADWIN, M. T.; KATO, G. J. Sickle Cell Disease : Advances in Pathogenesis and Management Cardiopulmonary Complications of Sickle Cell Disease : Role of Nitric Oxide. **Hematology**, n. 301, 2005.

LAPOUMÉROULIE, C.; DUNDA, O.; DUCROCQ, R. *et al.* A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Human Genetics**, v. 89, n. 3, p. 333-337, 1992.

LEW, V. L.; HOCKADAY, A.; SEPULVEDA, M. I. *et al.* Compartmentalization of sickle-cell calcium in endocytic inside-out vesicles. **Nature**, v. 315, n. 6020, p. 586-589, 1985.

LIPOWSKY, H. H.; KOVALCHECK, S.; ZWEIFACH, B. W. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. **Circulation Research**, v. 43, n. 5, p. 738-749, 1978.

LUTTY, G A; MCLEOD, D. S. A new technique for visualization of the human retinal vasculature. **Archives of ophthalmology**, v. 110, n. 2, p. 267-276, 1992.

LUTTY, G A; PHELAN, A.; MCLEOD, D. S.; FABRY, M. E.; NAGEL, R. L. A rat model for sickle cell-mediated vaso-occlusion in retina. **Microvascular Research**, v. 52, n. 3, p. 270-280, 1996.

LUTTY, GERARD A; MCLEOD, D. S. Chapter 20 ANGIOGENESIS IN SICKLE CELL RETINOPATHY. **Angiogenesis**, p. 389-405, 2008.

MANFREDINI, V.; CASTRO, S.; WAGNER, S. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Hemoglobin**, p. 4-7, 2007.

MAVILIO, F.; GIAMPAOLO, A; CARÈ, A; *et al.* Molecular mechanisms of human hemoglobin switching: selective undermethylation and expression of globin genes in embryonic, fetal, and adult erythroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 22, p. 6907-11, nov 1983.

MAY, A. Martin H. Steinberg, Bernard G. Forget, Douglas R. Higgs, David J. Weatherall: Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. **Human Genetics**, v. 128, p. 231-232, 2010.

MCLEOD, D. S.; BROWNSTEIN, R.; LUTTY, G A. Vaso-obliteration in the canine model of oxygen-induced retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 37, n. 2, p. 300-311, 1996.

MCLEOD, D. S.; LEFER, D. J.; MERGES, C; LUTTY, G A. Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 3, p. 642-653, 1995.

MOHAN, J. S.; LIP, P. L.; BLANN, A D.; BAREFORD, D; LIP, G. Y. H. The angiopoietin/Tie-2 system in proliferative sickle retinopathy: relation to vascular endothelial growth factor, its soluble receptor Flt-1 and von Willebrand factor, and to the effects of laser treatment. **The British journal of ophthalmology**, v. 89, n. 7, p. 815-9, jul 2005.

MOHANDAS, N.; ROSSI, M. E.; CLARK, M. R. Association between morphologic distortion of sickle cells and deoxygenation-induced cation permeability increase. **Blood**, v. 68, n. 2, p. 450-454, 1986.

MOUSA, S. A; AL MOMEN, A.; AL SAYEGH, F. *et al.* Management of painful vaso-occlusive crisis of sickle-cell anemia: consensus opinion. **Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 16, n. 4, p. 365-76, ago 2010.

MUSUMECI, S.; SCHILIRO, G.; PIZZARELLI, G. *et al.* The genetics and molecular basis of alpha thalassaemia in association with Hb S in Jamaican Negroes. **British Journal of Haematology**, v. 43, n. 3, p. 43-56, 1981.

NAGEL, R. L. Origins and dispersion of the sickle gene. In: EMBURY, S. H. (Ed.). **Sickle Cell Disease Basic Principles and Clinical Practice**. [S.l.]: Raven Press, 1994. p. 353-380.

NEEL, J. V. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. **Science**, v. 110, n. 2846, p. 64-66, 1949.

NUZZO, D. V. P. D.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções Sickle cell disease and infection. **Jornal de Pediatria**, p. 347-354, 2004.

OGATA, N.; MATSUOKA, M.; MATSUYAMA, K. *et al.* Plasma concentration of pigment

epithelium-derived factor in patients with diabetic retinopathy. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 92, n. 3, p. 1176-9, mar 2007.

PAULING, L.; ITANO, H. A. Sick cell anemia a molecular disease. **Science**, v. 109, n. 2835, p. 543-548, 1949.

PERUTZ, M. F. **Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. Heme-heme interaction and the problem of allostery.** *Nature*. [S.l: s.n.], 1970

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers in Bioinformatics. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, n. 2, p. 365-386, 2000.

RUCHAUD-SPARAGANO, M. H.; DROST, E. M.; DONNELLY, S. C. *et al.* Potential pro-inflammatory effects of soluble E-selectin upon neutrophil function. **European journal of immunology**, v. 28, n. 1, p. 80-9, jan 1998.

SEBASTIANI, P.; RAMONI, M. F.; NOLAN, V.; BALDWIN, C. T.; STEINBERG, MARTIN H. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nature genetics**, v. 37, n. 4, p. 435-40, abr 2005.

STEINBERG, M H; ROSENSTOCK, W.; COLEMAN, M. B. *et al.* Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. **Blood**, v. 63, n. 6, p. 1353-1360, 1984.

TOSTESON, D. C.; SHEA, E.; DARLING, R. C. Potassium and sodium of red blood cells in sickle cell anemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n. 4, p. 406-411, 1952.

VANNAY, A.; DUNAI, G.; BÁNYÁSZ, I. *et al.* Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. **Pediatric Research**, v. 57, n. 3, p. 396-398, 2005.

WOOD, K. C.; HEBBEL, ROBERT P; GRANGER, D. N. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. **The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 8, p. 989-991, 2005.

ANEXO I

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Informações sobre a pesquisa:

Título do projeto: Análise Bioquímica e Genética das Vias de Adesão Celular e Crescimento Vascular: Associação com o Desenvolvimento de Retinopatia Falciforme

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Telefone para contato: 019 35217936

As doenças falciformes podem levar a uma série de complicações vasculares, entre as quais, a retinopatia falciforme, a qual pode acarretar redução da visão. O principal objetivo desse estudo é esclarecer as causas genéticas da doença para que no futuro seja possível preveni-la e tratá-la.

Para participar do estudo é necessária sua permissão para colhermos uma amostra de 20 a 30 ml de sangue (o equivalente a duas colheres de sopa), como é feito em exames para anemia ou glicose. O exame é muito seguro e fora o desconforto da injeção não costuma causar efeitos colaterais. O sangue será colhido apenas uma vez. O exame oftalmológico ao qual será submetido é o mesmo realizado no ambulatório, como de costume. Você não corre riscos previsíveis tanto na coleta do sangue quanto no exame oftalmológico.

Será garantida, aos pacientes e responsáveis, respostas a quaisquer perguntas que possam ocorrer, em qualquer momento da pesquisa, e esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados com esta pesquisa.

O participante do estudo não receberá qualquer valor em dinheiro. Os resultados serão publicados e sua identidade será preservada.

O DNA extraído de cada paciente será preservado conforme o Regimento do Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG (UNICAMP) se o paciente assim o consentir.

Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo:

Eu, paciente ou responsável, aceito que a participação neste projeto de pesquisa é voluntária e que eu posso recusar ou retirar meu consentimento, a qualquer momento (incluindo sobre a amostra de sangue), sem comprometer os cuidados médicos que recebo ou receberei no futuro.

Fui informado que poderei autorizar que esse material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da(s) amostra(s).

- ☐ Inclui o armazenamento do material para pesquisa genéticas futuras.
- ☐ Determina que o material deva ser descartado após o término da pesquisa.

Nome e RG do sujeito da pesquisa

Consentimento

Eu, _____ RG _____,

abaixo assinado, estou de acordo em participar do estudo proposto acima, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer instante, sem prejuízo em meu acompanhamento ou tratamento. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Local e data: _____

Nome do paciente: _____

Nome e assinatura do responsável legal: _____

PARTICIPAÇÃO DE INDIVÍDUOS CONTROLE

Eu estou ciente de que a minha participação no estudo intitulado “Análise do Papel de Polimorfismos nos Genes VEGF e PEDF na Retinopatia Falciforme” será como um indivíduo controle em testes de biologia molecular.

Entendi que todas as informações constadas neste termo quanto a procedimentos, sigilo, resultados e contatos para resultados (se eu desejar saber), serão iguais aos demais indivíduos não-controle deste estudo. Fui informado também que poderei autorizar que o meu material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

Nome e RG do indivíduo controle

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

ANEXO II

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles)

PARTICIPAÇÃO DE INDIVÍDUOS CONTROLE

Eu estou ciente de que a minha participação no estudo intitulado “**Análise Bioquímica e Genética das Vias de Adesão Celular e Crescimento Vascular: Associação com o Desenvolvimento de Retinopatia Falciforme.**” será como um indivíduo controle em testes de biologia molecular.”

Entendi que todas as informações constadas neste termo quanto a procedimentos, sigilo, resultados e contatos para resultados (se eu desejar saber), serão iguais aos demais indivíduos não-controles deste estudo. Fui informado também que poderei autorizar que o meu material genético seja guardado no Banco de Material Biológico do Laboratório de Genética Molecular Humana CBMEG/UNICAMP. Caso este material venha a ser útil para outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética, estou ciente que serei informado para que autorize ou não o uso da (s) amostra (s).

Nome e RG do indivíduo controle

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

Telefone para contato: 19-3521-1143 (Mônica B. Melo)

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM – UNICAMP para dúvidas éticas e/ou reclamações: 19-3521-8936

ANEXO III



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/03/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 087/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0066.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ANÁLISE DO PAPEL DE POLIMORFISMOS NOS VENES VEGF E PEDF NA RETINOPATIA FALCIFORME".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mônica Babosa de Melo

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/02/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/03/10 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a frequência dos polimorfismos -64C/g e -116 G/A no promotor do gene VEGF e dos polimorfismos -790C/T e -358G/A nos promotores do gene PEDF em população brasileira de pacientes com anemia falciforme e doença de hemoglobina SC.

III - SUMÁRIO

Serão avaliados 200 pacientes, sendo 100 com hemoglobinopatias SS e SC (com ou sem renopatias). Serão colhidos 20 e 30 ml de sangue periférico. Será realizada a reação em cadeia da polimerase. Será realizado exame oftalmológico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um projeto de pesquisa que está bem elaborado. Foram apresentados: cronograma, orçamento, aspectos éticos da pesquisa. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está claro.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 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 à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com 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 projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de março de 2009.

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP