

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Análise de polimorfismos de óxido nítrico sintetase endotelial (T⁻⁷⁸⁶C, E298D e VNTR4a) e de receptores de quimiocinas (CCR2-64I e CCR5delta32) em indivíduos com anemia falciforme

Andréia Escosteguy Vargas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre

Março, 2005.

Instituições e Fontes Financiadoras:

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da UFRGS e contou com a colaboração do Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Este projeto foi desenvolvido com recursos das agências de fomento CAPES e CNPq.

Para Adriano

AGRADECIMENTOS

Bem, esta é a quarta vez que tento escrever aqui... logo o que pensei ser a parte mais fácil desta dissertação está se revelando a mais difícil...

Ao longo destes dois anos de mestrado conheci e convivi com muitas pessoas às quais quero agradecer, por vários motivos. Vou começar pelo começo, então...

Quero agradecer a meus pais e minhas irmãs, pelo incentivo e pelo apoio quando decidi mudar o rumo das coisas. Obrigada a vocês por confiar e acreditar que eu seria capaz!! Obrigada às minhas irmãs pelos pesados livros que eu pedia que retirassem das bibliotecas de suas respectivas faculdades!! Obrigada a meus pais porque me indicaram caminhos, mostraram-me como andar pelas próprias pernas e, assim, deram-me meios para escolher e trilhar o caminho que escolhi!!

Obrigada à minha querida amiga Japa, pelo empréstimo dos livros nos quais estudei para a prova de mestrado!! Obrigada, amiga, pelo apoio de sempre!!

Agradeço muito à Prof. Nance Nardi, a primeira pessoa com quem entrei em contato quando decidi voltar à UFRGS e fazer a seleção para o mestrado no Departamento de Genética. Foi ela quem me colocou em contato com o Prof. José Artur Chies, que veio a ser meu orientador. Agradeço à Nance também pelos conhecimentos adquiridos ao longo das duas disciplinas ministradas por ela, que cursei durante o mestrado, pelos ensinamentos diários e pela convivência dentro do laboratório. Obrigada por tudo!!

Agradeço aos demais professores cujas disciplinas cursei no mestrado, especialmente à Prof. Karen Haag, à Prof. Mara Hutz e ao Prof. Francisco Salzano, pelo estímulo à busca pelo conhecimento e pelos valiosos ensinamentos. Agradeço, ainda, ao Prof. Francisco Salzano pela paciência, pela disponibilidade e pelas importantes sugestões ao revisar esta dissertação.

Obrigada aos queridos e incansáveis Elmo e Ellen, pela eficiência profissional e pela ajuda de sempre!!

Quando o mestrado iniciou, a primeira pessoa do laboratório que conheci foi a Flavinha. O meu orientador nos apresentou rapidamente, no corredor do departamento. Ela usava um lenço na cabeça, sorriu e disse: “Seja bem-vinda!!” E desde então ganhei uma grande colega de laboratório e de disciplinas, e uma amigona!! Obrigadão, Flá, pelas muitas e boas risadas, por sempre esperar para almoçar quando eu estava enrolada com aquele monte de tubos na frente, pelo apoio, pelo incentivo nos momentos difíceis, pela força de sempre!! E é claro que eu não posso deixar de mencionar aqui o episódio fatídico em que me salvaste do chinelo arrebitado no dia em que eu dei minha primeira aula no curso de extensão!! Valeu, salvadora!! Agora Murphy sabe que não é tão fácil assim sabotar alguém quando tu estás por perto!!

Outra pessoa que conheci logo no início foi a Cida, a quem agradeço muito também porque foi quem coordenou as coletas das amostras lá no HCPA. Obrigadão, Cida, pela parceria, pela amizade, pela convivência e pela força que me deste nos momentos difíceis!! Agradeço também a todos do HCPA que contribuíram para a coleta de amostras e de dados, especialmente à acadêmica de Medicina Meide.

Foi em uma reunião do Laboratório de Imunogenética que eu conheci (ou melhor, vi!) todas as outras pessoas que viriam a ser meus colegas de laboratório. Eu me senti um peixe fora d'água no meio daquele monte de gente, que já se conhecia tão bem. Mas essa sensação não durou muito. Logo, a convivência fez daquele monte de gente, um monte de amigos!! E eu agradeço muito, muito mesmo, a todos eles, por muitas coisas:

Aos queridos colegas Andrei, Déia Wieck e P. (Paula), pela parceria nos PCRs, nos géis, e nas extrações de DNA. Obrigada ao Andrei também pela amizade, pelo “aluguel” das caixas de ponteiras e vidros de eppendorfs!! P., obrigada pela amizade, pelas boas

risadas, pelas piadas, enfim, por tornar as coisas mais leves dentro do lab!!

Obrigada aos colegas Lindolfo Meirelles, Dani Garcia, Dani Oberdoerfer e Tiago Dalberto, pela convivência e pela amizade!!

Obrigada à Anne Helene, pela amizade, por estar sempre pronta a ajudar e pelas fotos dos géis que me permitiu obter!! Valeu, Anne!!

Obrigada à Tati Gonzalez pela amizade, pelos almoços na salinha, por cuidar do estoque do super e pela força de sempre!!

Querida Lu, obrigada por tua alegria de sempre e pelas gargalhadas inconfundíveis, que levantam o astral de todos à tua volta!!

Querido Pedro, obrigada pela companhia na volta para casa, por sempre estar pronto a ajudar (quando entravas despreocupado no lab e eu te “alugava” para anotar meus resultados!!) e pela amizade de sempre!!

Ao Gustavo, obrigada pela amizade, pela força com as análises estatísticas e pela ajuda nos momentos finais (e difíceis!) deste mestrado!!

À querida Memel, uma grande colega, grande amiga e também “sócia”, agradeço pela força e pelo carinho de sempre, pelas vezes em que morreu de fome me esperando para almoçar e por sempre estar disposta a ajudar!! Valeu, amiga!!

Ao querido colega, amigo, mestre de todos nós e meu “semi-quase” irmão gêmeo Andrés, pelo exemplo que és no lab e fora dele, e por ser a pessoa com quem todos sabem que podem contar sempre (mesmo quando estás com a corda no pescoço!!)!! Valeu pela força de todas as horas!!

Quero agradecer também à Christiane Dresch, que iniciou a montagem do banco de DNA de indivíduos com anemia falciforme em nosso laboratório, durante seu trabalho de mestrado, à colega de departamento Kátia dos Santos, pelos dados relativos aos controles para os polimorfismos T⁻⁷⁸⁶C e E298D, e à Prof. Maria Cátira Bortolini, pelas amostras de

DNA que foram analisadas como controles para os polimorfismos CCR2-64I e VNTR 4a.

Agradeço muito a todos os pacientes com anemia falciforme que concordaram em participar do estudo, e espero sinceramente que o trabalho que desenvolvemos dentro dos laboratórios da universidade chegue até todas estas pessoas, um dia, sob a forma de uma qualidade de vida melhor. Acredito que a pesquisa não tem sentido se não reverte em algum benefício para a população que estamos estudando, mesmo que não seja um benefício imediato, mesmo que nossos resultados não apontem para uma solução direta. O que me moveu e me impulsionou a desenvolver este trabalho foi justamente a vontade de contribuir para que, lá na frente, este benefício seja alcançado.

A meu orientador...

Conheci o Prof. José Artur Chies quando decidi fazer a seleção para o mestrado. Ele me recebeu em sua sala e conversamos sobre a possibilidade de me orientar, caso eu passasse na seleção.

Então veio a prova, a entrevista, e o resultado final: fui aprovada. Eu estava retornando ao Departamento de Genética, depois de estar afastada alguns anos... e isso me deixava muito feliz, mas ao mesmo tempo temerosa e ansiosa.

O Prof. José Artur, então, tornou-se oficialmente meu orientador e começamos a trabalhar no que seria meu projeto de pesquisa. E por ter me dado esta chance, tendo aceito o desafio de orientar alguém que estava afastada da universidade, por todas as dificuldades que isso pode representar, eu te agradeço muito.

Com a convivência, o Prof. José Artur passou a ser o Zeca, porque na verdade é assim que todos o conhecem no departamento!! E o Zeca passou a ser, mais que um orientador, um amigo, um colega de trabalho. Tanto que se tornou muito difícil separar um do outro: o orientador, o amigo e o colega. E na maioria das vezes eu o vi, e vejo, simplesmente como um amigo, pois foi o amigo que mais esteve presente ao longo destes longos dois anos de mestrado: quando não conseguimos levar adiante nosso projeto de pesquisa original; quando me desesperava (e foram muitas as vezes em que me desesperei!!!), achando que eu não iria conseguir; quando me estressava (e... bom, estresse é meu nome do meio...) no laboratório; enfim, sempre que havia algo de errado, o Zeca procurava resolver as coisas como um amigo tenta nos ajudar em um momento difícil. E eu te agradeço muito pela paciência, pela confiança e pela amizade de sempre, que sem dúvida me permitiram concluir este trabalho.

Como colega de trabalho, o Zeca me ensinou tantas coisas que eu não saberia enumerar a todas... porque além dos muitos conhecimentos sobre imunologia, genética,

técnicas e procedimentos de laboratório, o Zeca me ensinou (mesmo que ele não tenha percebido!) que um bom profissional trabalha com seriedade, eficiência e responsabilidade, tem vontade de aprender sempre e nunca se acomoda. Eu te agradeço muito também pelo exemplo de profissional que és.

Pensando bem, o orientador Zeca, na verdade, é a mistura do amigo e colega de trabalho: esteve sempre presente nos momentos bons e nos momentos difíceis deste mestrado, e me incentivou a buscar e construir o conhecimento que adquiri ao longo deste período. E por ter contribuído tanto e ter participado do meu crescimento, do meu aprendizado, eu te agradeço muito sinceramente. Zeca, obrigada por tudo, sempre.

Ao Adriano...

És quem estive ao meu lado desde o momento inicial desta caminhada, e mesmo antes que ela começasse, tu me deste todo o apoio e o incentivo que eu precisava para tomar a difícil decisão de voltar ao Departamento de Genética da UFRGS.

Comemoraste comigo quando eu fui aprovada! E depois, ao longo das disciplinas, comemoraste comigo cada realização, cada resultado positivo!!

Ainda no primeiro ano de mestrado, te tornaste meu “namorado”!! Nesta época, estive sempre atento para que eu tivesse toda a estrutura necessária para desenvolver meu trabalho.

Ao longo do mestrado, foram muitas as vezes em que precisei ir até o campus, no fim do dia ou no sábado, e tu estive sempre pronto a me acompanhar. Ou quando chovia muito, tu não me deixavas ir sozinha, e saía de casa mais cedo para me levar!!

Durante o último ano, as coisas ficaram mais difíceis para mim... problemas para concluir os experimentos, o tempo ficando curto... e tu estive sempre do meu lado, me ouvindo, me dando força, me incentivando, sempre com muito amor e carinho para me confortar.

E no momento de concluir a dissertação, quando eu fiquei na frente do computador por horas a fio, passaste um feriado prolongado aqui comigo, tomaste conta da casa e de mim, sempre com o mesmo carinho, a mesma paciência, o mesmo amor.

Por tudo isso, por seres quem és, a pessoa que amo tanto, te agradeço muito e te dedico este trabalho, do qual és um dos pilares de sustentação. Obrigada por acreditar que eu seria capaz de chegar até aqui, obrigada por tua amizade, por teu companheirismo, por teu apoio e por teu amor, em todas as horas!! “Quero a vida sempre assim/Com você/Perto de mim...”

SUMÁRIO

TÓPICO.....	PÁGINA
1. Lista de abreviaturas.....	12
2. Resumo.....	14
3. Abstract.....	15
4. Capítulo 1 – Introdução.....	16
1.1. Anemia falciforme - bases moleculares.....	17
1.2. Anemia falciforme - dados históricos e populacionais.....	19
1.3. Anemia falciforme - características clínicas.....	22
1.4. Sistema imunológico.....	30
1.5. Anemia falciforme e sistema imunológico.....	31
1.6. Anemia falciforme e óxido nítrico endotelial.....	34
1.7. Objetivos.....	37
5. Capítulo 2 - Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease (manuscrito em preparação).....	39
6. Capítulo 3 – Discussão.....	61
7. Referências bibliográficas.....	70
8. Anexo 1 - Termo de consentimento pós-informação (modelo).....	81
9. Anexo 2 - Protocolo de anemia falciforme.....	82
10. Anexo 3 – Tabelas.....	85
11. Anexo 4 – Figuras.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: genótipo homocigoto para a hemoglobina adulta normal;

ACS: acute chest syndrome (síndrome aguda do peito);

AS: genótipo heterocigoto para o alelo *HBB**S;

BEN: haplótipo Benin;

C3: proteína do sistema do complemento-3;

CAR: haplótipo Bantu;

CCR: chemokine (C-C motif) receptor (receptor de quimiocina com motivo C-C);

CD: cluster of differentiation (grupo de diferenciação);

CVOs: crises vaso-oclusivas;

CXCR: chemokine (C-X-C motif) receptor (receptor de quimiocina com motivo C-X-C);

eNOS: endothelial nitric oxide synthase (óxido nítrico sintetase endotelial);

Fc: fragment, crystallizable (porção das imunoglobulinas que tem propensão a auto-associar-se e cristalizar);

FCP: F-cell production (produção de células F);

Gpx: glutathione peroxidase;

HbA: hemoglobina adulta normal;

*HBB**S: alelo que codifica a hemoglobina S;

HbF: hemoglobina fetal;

HbS: hemoglobina S;

HU: hidroxúria;

IgG: imunoglobulina G;

ISCs: irreversibly sickled cells (células irreversivelmente falcemizadas);

KO: knockout (nocaute);

MCP-2: monocyte chemotactic protein-2 (proteína quimiostática de monócito-2);

NO: nitric oxide (óxido nítrico);

pb: pares de base;

PI: proliferation index (índice de proliferação);

PS: phosphatidylserine (fosfatidilserina);

ROS: reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio);

SC: genótipo duplo-heterozigoto para alelos *HBB**S e *beta-C*;

SEN: haplótipo Senegal;

SOD: superóxido dismutase;

SS: genótipo homozigoto para o alelo *HBB**S;

TNF- α : tumor necrosis factor- α (fator de necrose de tumor- α);

TSP: trombospondina;

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1 (molécula de adesão de célula vascular-1);

VLA-4: very late activation antigen-4 (antígeno de ativação tardia-4);

VNTR: variable number of tandem repeat;

VO: vaso-oclusão;

vWF: von Willebrand factor (fator de von Willebrand);

ZL: zileuton.

RESUMO

À medida em que avançamos no entendimento da anemia falciforme, percebemos que esta hemoglobinopatia se apresenta como uma doença complexa, na qual o defeito genético e suas conseqüências diretas não são suficientes para explicar a ampla heterogeneidade clínica observada nos pacientes portadores do alelo *HBB**S. Um número crescente de fatores (ambientais e genéticos) vêm sendo relacionados a diferentes aspectos da expressão clínica da anemia falciforme. Uma abordagem mais ampla desta doença permitiu formular a hipótese que a anemia falciforme seria uma condição inflamatória crônica, conceito apoiado por diversos trabalhos realizados nas últimas décadas. Neste contexto, e com a intenção de contribuir na busca de características genéticas envolvidas na modulação do quadro clínico heterogêneo da anemia falciforme, estudamos os polimorfismos de receptores de quimiocinas CCR2-64I e CCR5delta32, bem como três polimorfismos estabelecidos no gene *NOS3*, todos estes genes envolvidos em processo inflamatório. Nossos resultados indicam que os polimorfismos analisados não estão diretamente associados ao desenvolvimento de um quadro clínico severo nos pacientes estudados. No entanto, observamos uma tendência para o desenvolvimento de um quadro clínico severo em indivíduos portadores de determinadas variantes alélicas. O aumento no número amostral, bem como a análise de outros marcadores de severidade do quadro clínico da anemia falciforme, poderão auxiliar no estabelecimento do papel destas variantes na modulação do quadro clínico desta doença.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is an inherited disorder that presents extremely variable clinical manifestations. It has been approached as an inflammatory disorder within the past decades and several works have tried to determine which factors are involved in such characteristic. In order to contribute to the characterization of the genetic differences underlying this phenotypic diversity in SCD, we proposed to study the distribution of polymorphic variants of the genes encoding the chemokine receptors CCR2 (CCR2-64I) and CCR5 (CCR5delta32), as well as three well-characterized polymorphisms in the *NOS3* gene. Our results indicate that the polymorphisms studied here are not directly associated to the development of a severe clinical course in this group of patients. Nevertheless, we observed a tendency to the development of a severe clinical course in carriers of some of the variant alleles studied here. Further studies including a larger sample of patients and other severity markers of SCD should be carried out in order to determine the role of such variants in the modulation of the clinical picture in this disorder.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1.1. ANEMIA FALCIFORME - BASES MOLECULARES

A anemia falciforme foi primeiramente descrita por Herrick (1910), ao apresentar o caso de um estudante indiano com anemia severa cujas células sangüíneas possuíam um “formato alongado peculiar” (para revisão vide Lessin e Jensen, 1974 e Serjeant, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a anemia falciforme é a doença monogênica mais comum no Brasil. Em relatório de 1998, este órgão estimou a existência de cerca de 8 mil casos da doença no país (OPAS/OMS, 1998).

A deformação dos eritrócitos observada na anemia falciforme é resultado da presença da hemoglobina mutante S (HbS) nestas células, a qual precipita sob baixas tensões de oxigênio (hipoxia) e forma polímeros que alteram a morfologia celular (Emmel, 1917 e Sherman, 1940 *apud* Lessin e Jensen, 1974; Pauling *et al.*, 1949). A reoxigenação permite que a célula retorne ao formato normal, conforme observou Sherman (1940 *apud* Lessin e Jensen, 1974), porém após diversos ciclos de hipoxia/reoxigenação os eritrócitos se tornam permanentemente falcêmicos. A falcemização dos eritrócitos é responsável pela redução de sua vida média e pela perda de células por hemólise, levando os pacientes a uma anemia crônica (para revisão vide Davies *et al.*, 2000 e Naoum, 2000).

Em um estudo clássico, Pauling *et al.* (1949) observaram, devido à mobilidade eletroforética diferencial, que a hemoglobina dos indivíduos com anemia falciforme tem carga elétrica diferente daquela de indivíduos normais: a hemoglobina dos pacientes migra mais lentamente que a hemoglobina de indivíduos não afetados. Desta maneira, Pauling *et al.* (1949) demonstraram pela primeira vez na literatura a relação causal entre uma proteína anormal e uma doença, caracterizando a anemia falciforme como uma “doença molecular”. Além disso, os autores reportaram que indivíduos apresentando traço falciforme tinham quantidades semelhantes de hemoglobina falcêmica e normal, concluindo que o gene responsável pela doença está em heterozigose nestes pacientes e em homozigose naqueles

portadores de anemia falciforme (para revisão vide Eaton, 2003).

Segundo Lessin e Jensen (1974), Neel, no mesmo ano de 1949, confirmou sugestões prévias de que o traço falciforme seria referente à condição heterozigota. Serjeant (2001) salienta que Beet (1949 *apud* Serjeant, 2001) chegou a conclusões semelhantes a respeito da genética da anemia falciforme estudando uma tribo Bantu. Curiosamente, Azevêdo (1973) relata um artigo publicado em português por Accioly (1947 *apud* Azevêdo, 1973), onde este autor apresenta sua hipótese sobre as características genéticas do traço falciforme e da anemia falciforme. Accioly (1947 *apud* Azevêdo, 1973) propôs que pacientes com anemia falciforme são homozigotos para um determinado alelo, o qual em heterozigose provocaria o traço falciforme. Esta sugestão foi ilustrada por uma genealogia, e o autor empregou corretamente termos como fenótipo, genótipo, homozigoto e heterozigoto para formular sua hipótese. Porém, o trabalho foi publicado em uma revista brasileira de circulação restrita. Neel desenvolveu a mesma hipótese de maneira independente e a publicou em 1947 (Neel, 1947 *apud* Azevêdo, 1973), vindo a confirmá-la em sua publicação de 1949 (Lessin e Jensen, 1974). Desta forma, determinou-se que a anemia falciforme segue padrão de herança autossômico recessivo: pais heterozigotos portadores da mutação (*AS*) transmitem, cada um, uma cópia do alelo mutante para o descendente afetado (*SS*).

A diferença de aminoácidos entre as hemoglobinas normal (*HbA*) e falcêmica (*HbS*) foi identificada por Ingram (1959): na molécula da *HbS* ocorre a substituição de um ácido glutâmico por uma valina, o que decorre de uma mutação pontual na posição 6 da cadeia da β -globina ($GAG \rightarrow GTG$) conforme demonstrado posteriormente (para revisão vide Serjeant, 2001). A troca de um aminoácido negativamente carregado (ácido glutâmico) por um aminoácido neutro (valina) faz com que a *HbS* migre mais lentamente que a *HbA*, quando submetida à eletroforese, conforme haviam observado Pauling *et al.* (1949).

A molécula da hemoglobina apresenta estrutura tetramérica, formada por duas cadeias de α -globina e duas cadeias de β -globina. Os genes que codificam as cadeias de β -globina humanas foram mapeados no cromossomo 11 (Deisseroth *et al.*, 1978) e formam um *cluster* de aproximadamente 50kb, que inclui 5 genes funcionais (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β) e 1 pseudogene ($\psi\beta 1$). A β -globina tipo β é produzida durante a vida adulta do indivíduo, enquanto as cadeias ϵ e γ são expressas nas fases embrionária e fetal, respectivamente (para revisão, vide Weatherall, 1997). O gene da β -globina tipo β foi mapeado na região 11p15.5 (Lin *et al.*, 1985).

1.2. ANEMIA FALCIFORME - DADOS HISTÓRICOS E POPULACIONAIS

Acredita-se que a mutação que produz a HbS (β^S) tenha ocorrido há 50-100 mil anos atrás (revisado por Naoum, 2000). Estudos iniciais discordavam quanto ao local de origem da mutação β^S , alguns apontando a Ásia (Lehmann *et al.*, 1963) e outros, a África (Gelpi, 1973). Entretanto, estudando um grupo de pacientes jamaicanos com anemia falciforme, Wainscoat *et al.* (1983) encontraram um grande número de haplótipos diferentes, apoiando a hipótese de origem múltipla para a mutação β^S (*apud* Wainscoat, 1987). Trabalhos posteriores indicaram que esta mutação parece ter surgido em pelo menos quatro eventos independentes nas populações africanas: em Benin, na República Africana Central, no Senegal e em Camarões (Pagnier *et al.*, 1984; Chebloune *et al.*, 1988; Lapoumeroulie *et al.*, 1992). Além disso, o estudo de grupos populacionais da Arábia Saudita e da Índia sugeriu o surgimento independente do alelo mutante para HbS (HBB^*S) na Ásia (Kulozik *et al.*, 1986). Estas mutações estão associadas a haplótipos denominados de acordo com sua origem geográfica: Benin (BEN), Bantu (CAR), Senegal (SEN), Camarões e Árabe-Indiano ou Asiático, respectivamente.

O alelo HBB^*S é bastante comum em países onde a malária causada por *Plasmodium*

falciparum é endêmica, observação que levou à hipótese de efeito protetor deste alelo para heterozigotos portadores, contra o desenvolvimento da doença (para revisão atualizada vide Abdulhadi, 2003). Estudos iniciais a respeito dos mecanismos envolvidos nesta proteção apontavam para fatores como a falcemização seletiva de eritrócitos parasitados resultando em sua remoção mais efetiva pelo baço e a inibição do crescimento do parasita devido ao baixo pH das células falcêmicas (para revisão vide Serjeant, 2001). Trabalhos utilizando camundongos transgênicos, expressando diferentes níveis de HbS e infectados com diferentes tipos de malária murina, têm confirmado o efeito protetor conferido pela hemoglobina S e auxiliado na elucidação dos mecanismos envolvidos nesta proteção (Shear *et al.*, 1993; Hood *et al.*, 1996, Shear *et al.*, 1998). Abdulhadi (2003) propôs que os mecanismos envolvidos na proteção contra malária conferida pelo *HBB**S incluem a alteração de ligantes a moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos falcêmicos, modulando a aderência destes a neutrófilos e contribuindo para a eliminação dos eritrócitos infectados. A malária causada por *P. falciparum* parece ter sido a força seletiva responsável pela expansão do alelo *HBB**S há aproximadamente 4 mil anos na Índia e 3 mil anos na África (Nagel & Fleming, 1992).

O alelo *HBB**S expandiu-se também para países da Europa devido a migrações oriundas da bacia do Mediterrâneo, devido a rotas comerciais traçadas a partir do centro-oeste africano, e devido ao tráfico de escravos norte-africanos, por exemplo, ocorrendo em regiões como Sicília, no sul da Itália, norte da Grécia e Portugal (Ragusa *et al.*, 1988; Boussiou *et al.*, 1991; Lavinha *et al.*, 1992). No Reino Unido, o Departamento de Saúde estimou que cerca de 5 mil indivíduos eram homozigotos para o alelo mutante, em 1993 (Davies & Oni, 1997).

A introdução do alelo *HBB**S no continente americano, e conseqüentemente no Brasil, se deu entre os séculos XVI e XIX, devido ao intenso tráfico de escravos africanos

destinados ao trabalho nas colônias européias (para revisão vide Naoum, 2000). Durante este período, estima-se que mais de 3 milhões de africanos aportaram nos estados brasileiros do Rio de Janeiro e da Bahia, vindos principalmente da costa ocidental da África (Salzano, 1986). De acordo com o IBGE, no ano 2000, a população brasileira era composta por cerca de 6,2% de pretos e de 38,4% de pardos (IBGE, 2000). O IBGE utiliza as categorias branco, pardo e preto para designar indivíduos fenotipicamente caucasóides, miscigenados e negróides, respectivamente. Neste trabalho, utilizou-se o termo Afro-brasileiro, ou Afro-descendente, para designar indivíduos brasileiros fenotipicamente negros. O termo Afro-americano se refere aos indivíduos fenotipicamente negros, norte-americanos. Tal nomenclatura não leva em consideração a ancestralidade dos indivíduos, mas apenas a cor da sua pele.

A Organização Mundial da Saúde estimou a existência de 2 milhões de portadores do alelo *HBB*S* no Brasil (OPAS/OMS, 1998). Em comparação, a frequência deste alelo em Afro-americanos foi estimada em 8%, com uma proporção de aproximadamente 1 indivíduo afetado pela anemia falciforme em cada 500 indivíduos Afro-americanos (para revisão vide Sutton *et al.*, 1999). Os haplótipos mais frequentes entre Afro-descendentes brasileiros diferem daqueles encontrados em Afro-americanos, consequência dos distintos padrões de tráfico de escravos para as Américas do Norte e do Sul (para revisão vide Zago *et al.*, 1992). Em uma análise realizada em pacientes do sudeste brasileiro, o haplótipo CAR foi observado em 66,2% dos casos, e o haplótipo BEN em 23% dos casos. Neste estudo, as combinações haplotípicas mais comuns foram CAR/CAR (encontrada em 19 de 37 pacientes) e CAR/BEN (em 9 de 37 pacientes) (Zago *et al.*, 1992). Analisando indivíduos Afro-brasileiros da região amazônica do Brasil, Pante-de-Sousa *et al.* (1999) encontraram a seguinte distribuição haplotípica: 60% BAN, 30% SEN e 10% BEN. Gonçalves *et al.* (2003) realizaram estudo recente em pacientes de Salvador (BA) e

observaram predominância da combinação CAR/BEN (46,25% dos casos) nestes indivíduos.

1.3. ANEMIA FALCIFORME - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A precipitação da HbS e a formação de polímeros, que ocorrem sob hipoxia, têm como conseqüência a deformação dos eritrócitos. Este processo pode ser revertido ao se restabelecer tensões normais de oxigênio, porém, após repetidos eventos de hipoxia-reoxigenação, o eritrócito acumula danos irreversíveis em sua membrana e se torna permanentemente falcêmico (para revisão vide Lessin e Jensen, 1974 e Steinberg e Rodgers, 2001).

As células irreversivelmente falcêmicas (ISCs, *irreversibly sickled cells*) têm vida média reduzida e indivíduos que têm grande quantidade destas células apresentam maior grau de hemólise. Em conseqüência das alterações protéicas que acumularam em sua membrana, as ISCs são mecanicamente frágeis, o que contribui para o elevado grau de hemólise observado. Além disso, as ISCs apresentam depósitos anormais de moléculas de IgG em sua superfície, o que promove sua fagocitose e destruição por fagócitos mononucleares (monócitos e neutrófilos), através da ligação de receptores para porção Fc presentes nestas células às IgGs de superfície (revisado por Hebbel, 1991).

Outra característica clínica observada em pacientes com anemia falciforme, além da anemia severa, é a ocorrência de eventos de vaso-oclusão (VO). Acredita-se que estes eventos sejam o reflexo de características intrínsecas ao eritrócito falcêmico, como a concentração de polímeros de HbS e o grau de dano acumulado em sua membrana, além de resultado da interação destas células com seu meio (Steinberg e Rodgers, 2001).

Hoover *et al.* (1979) reportaram que os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme apresentam adesão anormal ao endotélio vascular e sugeriram o envolvimento

desta característica na VO, o que foi reforçado por Hebbel *et al.* (1980), ao descrever forte correlação entre a capacidade de adesão dos eritrócitos e a severidade clínica da VO. A partir destes estudos, passou-se a considerar a possibilidade que a maior adesão observada nestes eritrócitos poderia contribuir para o atraso do fluxo sanguíneo, permitindo ou amplificando a falcemização das células ao aumentar o tempo de trânsito destas pela vasculatura, conseqüentemente contribuindo para a evolução da VO (Hebbel, 1997). O início da VO seria um processo de duas etapas, conforme observaram Fabry *et al.* (1992): a adesão anormal seria o evento desencadeador, propiciando o atraso do fluxo e permitindo a falcemização das células, enquanto os eritrócitos deformados participariam da fase de propagação, ficando presos nos vasos e obstruindo o fluxo sanguíneo através deles.

Inicialmente, atribuiu-se a maior adesão observada em células falcêmicas à superfície anormal da membrana destas células. Estudos subseqüentes sugeriram que fatores no plasma dos pacientes com anemia falciforme poderiam aumentar a adesão dos eritrócitos. Estas observações estabeleceram o princípio que a adesão anormal das células falciformes reflete não apenas características inerentes à sua membrana, sendo também reflexo da presença de determinados fatores no ambiente celular (Hebbel, 1997).

Estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem o envolvimento de diversas moléculas de adesão nas interações entre eritrócitos e endotélio vascular: a integrina $\alpha 5\beta 3$, moléculas CD36, fibronectina e VCAM-1, expressas na superfície de células endoteliais; glicolípídeos sulfatados, fosfatidilserina (PS), CD36 e integrina $\alpha 4\beta 1$ (ou VLA-4), na superfície de eritrócitos. Proteínas plasmáticas, como o fator de von Willebrand (vWF) e a trombospondina (TSP), fariam a ponte entre as proteínas de células endoteliais e de eritrócitos. No entanto, o papel destas moléculas em seres humanos, *in vivo*, ainda não está bem estabelecido (para revisão vide Harlan, 2000, Okpala, 2004 e Hebbel *et al.*, 2004).

Hebbel (1997) faz, porém, uma reflexão sobre as tentativas de se identificar “o”

mecanismo responsável pela adesão anormal de células sanguíneas *in vivo*: sendo a patofisiologia desta doença muito complexa, parece muito provável que a VO mediada pela adesão anormal dos eritrócitos possa envolver diferentes mecanismos, dependendo do momento, do paciente, ou até mesmo do órgão considerado. As observações de Lee *et al.* (2001) apóiam a idéia que a modulação da expressão de uma única molécula adesiva (CD36, neste caso) não é suficiente para conter o processo que leva à VO. Os resultados deste trabalho sugerem que a presença ou ausência de CD36 em reticulócitos e eritrócitos falcêmicos não tem efeito na severidade da anemia falciforme, uma vez que o número de hospitalizações devidas a crises de dor foi semelhante em ambos os grupos de pacientes analisados (CD36+ e CD36-). De acordo com Setty *et al.* (2002), outros mecanismos, como aquele mediado por PS, podem ser mais importantes na interação eritrócitos-endotélio do que a ligação CD36:TSP. Estudos recentes têm apontado outras proteínas envolvidas no mecanismo de adesão de eritrócitos ao endotélio vascular (Kaul *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001), indicando a complexidade deste evento e a necessidade de maiores investigações para a elucidação de todos os fatores envolvidos

O conjunto dos estudos realizados acerca das interações adesivas entre os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme e as células endoteliais levou à elaboração do modelo *multistep* atualmente utilizado para explicar a VO, no qual eritrócitos jovens aderem ao endotélio, prendem ISCs e, desta forma, geram obstrução vascular e isquemia (Hebbel, 1997).

Ao testar este modelo *in vivo* utilizando camundongos, Turhan *et al.* (2002) observaram a interação de eritrócitos com leucócitos aderentes ao endotélio em indivíduos homocigotos *SS*, o que não ocorreu em indivíduos *AS* e *AA*. A administração da citocina pró-inflamatória TNF- α amplificou esta interação, chegando a provocar vaso-oclusão completa. A partir destas observações, os autores sugeriram que leucócitos aderentes à

parede endotelial podem contribuir diretamente para a VO, através de interação com os eritrócitos. Fadlon *et al.* (1998) já haviam sugerido que leucócitos polimorfonucleares teriam papel co-patogênico na VO, pois tais células derivadas de pacientes em crise apresentaram maior adesão ao endotélio *in vitro* quando comparadas a células de pacientes estáveis ou de indivíduos controle sadios. Evidências e mecanismos da participação de leucócitos na anemia falciforme foram revisados por Okpala (2004).

A oclusão da microvasculatura manifesta-se clinicamente como crises de dor (devido a pequenas crises vaso-oclusivas, CVOs), enquanto a oclusão da macrovasculatura parece ser a causa da lesão de órgãos como rins, pulmões e baço, observada na anemia falciforme (Ballas & Mohandas, 1996).

As crises de dor estão entre as principais causas de hospitalização dos pacientes com anemia falciforme. Estes eventos são marcados por dores musculares, manifestando-se principalmente nas costas, nos membros superiores e inferiores, no peito e no abdômen, e podem ser desencadeados por infecções, temperaturas extremas e estresse físico ou emocional (Sutton *et al.*, 1999). A frequência e a intensidade das crises de dor variam muito entre os pacientes (Platt *et al.*, 1991). O número de crises de dor por ano (*pain rate*) tem sido usado como medida de severidade clínica da doença e tem demonstrado correlação com a morte prematura de pacientes com idade superior a 20 anos (Platt *et al.*, 1991; Platt *et al.*, 1994; Makis *et al.*, 2000; Inati *et al.*, 2003). Miller *et al.* (2000) consideraram uma *pain rate* igual ou superior a duas crises de dor por ano como indicativo de quadro clínico severo. Estudos recentes sugerem que as altas contagens de leucócitos e os níveis de plaquetas aumentados observados em pacientes com anemia falciforme poderiam, também, estar envolvidos na patofisiologia da vaso-oclusão (para revisão vide Serjeant, 2001).

Os pacientes com anemia falciforme caracterizam-se também pela alta

susceptibilidade a infecções, especialmente por pneumococos e, principalmente, durante a infância. Na década de 70, as infecções bacterianas eram a principal causa de hospitalização dos pacientes e a principal causa de morte de crianças com anemia falciforme (Barret-Connor, 1971). Avanços no entendimento e no tratamento da doença, bem como a implementação de triagem de recém-nascidos, a administração profilática de penicilina, vacinas conjugadas contra pneumococos e *Haemophilus influenzae*, e outras intervenções terapêuticas, contribuíram para a redução do número de infecções fatais e para o aumento do tempo de sobrevivência das crianças com anemia falciforme (Quinn *et al.*, 2004).

A síndrome aguda do peito (*acute chest syndrome*, ACS) é outra manifestação clínica importante da anemia falciforme, sendo apontada como segunda causa mais comum para hospitalizações e responsável por cerca de 25% das mortes relacionadas à doença. Os sintomas mais frequentes da ACS são febre, tosse e dor no peito, variando de acordo com a faixa etária dos pacientes. Diferenças no quadro clínico apresentado por crianças e adultos apóiam a hipótese de etiologia múltipla para a ACS: infecção foi apontada como a causa da ACS infantil, enquanto a VO seria responsável pela síndrome em adultos (Vichinsky *et al.*, 1997).

O quadro clínico observado na anemia falciforme é extremamente variável, apesar de todos os indivíduos afetados possuírem a mesma mutação pontual como causa da doença (para revisão atualizada vide Ballas & Mohandas, 2004). Esta variabilidade clínica inclui desde casos benignos (Alayash *et al.*, 1989; Thomas *et al.*, 1997) até casos de alta morbidade (em que o paciente necessita de diversas internações hospitalares, devidas a crises de dor, infecções, transfusões sanguíneas, e apresenta comprometimento de órgãos), e tem sido atribuída a múltiplos fatores ambientais e hereditários (Naoum, 2000; Serjeant, 2001).

Dentre os fatores ambientais que interferem no quadro clínico da anemia falciforme encontram-se as condições nutricionais do paciente e o acesso à assistência médica qualificada (Naoum, 2000; Serjeant, 2001).

Os fatores genéticos que podem influenciar a manifestação clínica da anemia falciforme, definidos até o presente, são os níveis de hemoglobina fetal (HbF), os haplótipos associados ao alelo *HBB* α S*, a presença concomitante de α -talassemia, o gênero, e efeitos de determinados genes epistáticos. A deficiência de enzimas anti-oxidantes (SOD, Gpx, catalase), por exemplo, pode contribuir para a maior susceptibilidade à oxidação da hemoglobina, influenciando na destruição precoce dos eritrócitos em pacientes com anemia falciforme (para revisão vide Naoum, 2000, Nagel & Steinberg, 2001 e Serjeant, 2001).

A presença de HbF diminui a polimerização da HbS, uma vez que aquela forma de hemoglobina não participa da formação de polímeros. Uma maior concentração de HbF, portanto, implica em redução na falcemização dos eritrócitos e, conseqüentemente, em redução da VO (revisado por Atweh *et al.*, 1999). Os níveis de HbF em adultos são muito variáveis tanto em indivíduos normais quanto em indivíduos com anemia falciforme. O principal fator responsável por esta variação em pacientes jamaicanos e franceses foi o locus FCP (*F-cell production*) ligado ao X, que regula a produção de células F, as quais representam o conjunto de eritrócitos ao qual a HbF fica restrita após o nascimento (Chang *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1997). Em modelos animais desenvolvidos para o estudo da anemia falciforme, maiores níveis de HbF demonstraram correlação positiva com a melhora do quadro anêmico associado à doença (Fabry *et al.*, 2001). Clinicamente, altos níveis de HbF também foram associados a um curso mais benigno da doença, caracterizado pela diminuição de eventos vaso-oclusivos e por maior expectativa de vida (Hutz & Salzano, 1983; Platt *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997).

Estas observações influenciaram o direcionamento dos estudos com ênfase em terapia para a busca de agentes capazes de aumentar os níveis de HbF em pacientes com anemia falciforme. Substâncias citotóxicas, como 2-desoxi 5-azacitidina (Koshy *et al.*, 2000) e hidroxiuréia (HU) (de Montalembert *et al.*, 1997; Maier-Redelsperger *et al.*, 1999; Ferster *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2003; Steinberg *et al.*, 2003; para revisão vide Halsey & Roberts, 2003), fatores de crescimento hematopoiético, como a eritropoietina (el-Hazmi *et al.*, 1995; para revisão vide Saleh & Hillen, 1997), além de zileuton (ZL), um análogo estrutural da HU (Haynes *et al.*, 2004), butirato e outros ácidos graxos de cadeia curta (Blau *et al.*, 1993; Dover *et al.*, 1994; Liakopoulou *et al.*, 1995; Atweh *et al.*, 1999) têm sido avaliados quanto à capacidade de induzir a produção de HbF nestes pacientes. De acordo com Claster & Vichinsky (2003), a HU é a mais promissora dentre as novas terapias disponíveis para o tratamento da anemia falciforme. Seus efeitos benéficos incluem, além do aumento dos níveis de HbF, a modificação das interações entre eritrócitos e endotélio vascular e a redução da contagem de leucócitos (para revisão vide Halsey & Roberts, 2003).

Estudos demonstraram que os haplótipos SEN e Árabe-Indiano estão associados a uma expressão mais branda da anemia falciforme. Seus portadores apresentaram níveis mais altos de HbF e anemia mais leve, quando comparados aos portadores dos demais haplótipos existentes (Nagel *et al.*, 1985; Kulozik *et al.*, 1987; Ramana *et al.*, 2000).

A expressão clínica mais branda observada em um grupo de pacientes tribais indianos, onde predominou o haplótipo Árabe-Indiano, foi atribuída à presença de α -talassemia, que agiria neste caso como fator epistático na manifestação mais leve da doença (Ramana *et al.*, 2000). Entretanto, a influência da α -talassemia sobre as manifestações clínicas da anemia falciforme é ainda debatida, pois dados da literatura apontam tanto para efeitos prejudiciais (como maior retinopatia e esplenomegalia), quanto

para efeitos benéficos (maior sobrevida, diminuição de acidentes vasculares cerebrais) além de existirem dados controversos sobre a síndrome aguda do peito e o número de CVOs (Ballas, 2001).

Inati *et al.* (2003) reportaram, surpreendentemente, que não houve correlação significativa entre os diferentes haplótipos analisados e as manifestações clínicas observadas em pacientes libaneses com anemia falciforme. Além disso, quando os valores de HbF foram correlacionados com as crises de dor, nestes pacientes, os casos mais severos apresentaram os maiores valores de HbF. Desta forma, os autores sugeriram que outros fatores genéticos, além do haplótipo, poderiam influenciar nos níveis de HbF destes indivíduos, e que os altos níveis de HbF por si só não seriam suficientes para contrapor esta tendência genética ao desenvolvimento de um quadro clínico severo.

A anemia falciforme está geralmente associada à mortalidade precoce. A idade média de óbito para pacientes com a doença foi estimada em 16 anos por Hutz & Salzano (1983), estudando um grupo de 409 pacientes provenientes do Rio de Janeiro. Este achado estava de acordo com dados norte-americanos e jamaicanos do mesmo período. Analisando um grupo de 3764 pacientes norte-americanos, Platt *et al.* (1994) estabeleceram que a idade média de óbito para homens e mulheres com anemia falciforme foi de 42 e 48 anos, respectivamente. Esta análise incluiu desde recém-nascidos até indivíduos com 66 anos de idade, no início do estudo. O considerável aumento observado na expectativa de vida dos pacientes é atribuído a avanços clínicos nos últimos trinta anos, como a triagem de recém-nascidos, a utilização de penicilina como profilaxia para infecções e de HU para prevenção de crises vaso-oclusivas (Claster & Vichinsky, 2003).

1.4. SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico tem a capacidade de reagir a microorganismos e substâncias (de origem protéica ou não) apresentadas em um contexto infeccioso. O efeito dessas reações no organismo é a sua defesa contra patógenos e toxinas, através de diferentes mecanismos e com o envolvimento de diversos tipos celulares.

Os mecanismos de imunidade inata (tais como barreiras físicas e químicas, fagócitos e citocinas) promovem a defesa inicial contra infecções, enquanto a imunidade adaptativa se desenvolve posteriormente, consistindo inicialmente da ativação de linfócitos (Abbas *et al.*, 2000).

Grande parte dos agentes infecciosos induz uma resposta inflamatória através da ativação da imunidade inata. Macrófagos ativados (após ingestão de bactérias, por exemplo) secretam citocinas e quimiocinas, as quais aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos, permitindo a passagem de fluido e proteínas para os tecidos, e recrutam neutrófilos (os quais são células inflamatórias) para o local da infecção. O acúmulo local de fluido, proteínas plasmáticas e leucócitos (aqui representados por neutrófilos e macrófagos), que pode ser iniciado por infecção, dano físico ou resposta imunológica local, é denominado de inflamação, ou resposta inflamatória. As características da inflamação são definidas pelos termos, em Latim, *calor, dolor, rubor, e tumor*, ou seja, calor, dor, vermelhidão e inchaço, sintomas que refletem os efeitos das citocinas e outros mediadores de inflamação nos vasos sanguíneos locais (Janeway *et al.*, 2001).

O processo de inflamação local pode ser disparado também pela ativação do complemento, um sistema de proteínas plasmáticas que reagem a patógenos extracelulares, facilitando seu reconhecimento e eliminação por fagócitos. As citocinas e os componentes do complemento têm efeito importante também nas propriedades adesivas do endotélio vascular, provocando a adesão de leucócitos circulantes a células da parede dos vasos e sua

migração para o local de infecção, para o qual são atraídos por quimiocinas. Esta migração de células para o tecido, bem como sua ação local, são responsáveis pela dor observada no processo inflamatório (Janeway *et al.*, 2001).

1.5. ANEMIA FALCIFORME E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Uma das características comuns aos pacientes com anemia falciforme é sua maior susceptibilidade a infecções, quando comparados a indivíduos saudáveis. Dentre os patógenos que causam infecções sérias em crianças com anemia falciforme encontram-se *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (Barrett-Connor, 1971). Em uma análise de pacientes com anemia falciforme com idade inferior a 5 anos de idade, Wong *et al.* (1992) encontraram uma taxa de infecção por *S. pneumoniae* de 30-100 vezes maior do que aquela esperada para uma população-controle da mesma faixa etária.

Estudos que buscam definir as causas da alta frequência de infecções associada à anemia falciforme inferem que a recorrência de episódios de VO nos indivíduos afetados resultaria na atrofia do baço, o que conseqüentemente diminuiria sua função e provocaria a condição conhecida por hipofunção esplênica. O baço é considerado o principal sítio de resposta imunológica a antígenos trazidos pela corrente sanguínea, funcionando como um “filtro” para o sangue. O baço é também considerado como o principal local de fagocitose de microorganismos opsonizados (cobertos por anticorpos). A opsonização de *S. pneumoniae*, mediada pelas vias alternativa e clássica do complemento, foi medida em crianças com anemia falciforme e comparada àquela de seus irmãos saudáveis, de faixa etária semelhante (Bjornson *et al.*, 1985). Os autores observaram que a atividade sérica de opsonização para *S. pneumoniae*, mediada por ambas as vias do complemento, estava diminuída nos pacientes com a doença. Porém, os níveis séricos de C3 e de complemento

hemolítico total, na maioria dos pacientes, apresentaram valores dentro da faixa da normalidade. Desta forma, os autores sugeriram que fatores séricos auxiliares estariam implicados nas alterações de opsonização observadas, ao invés de um defeito intrínseco no sistema do complemento.

A hipofunção esplênica e as falhas do complemento, entretanto, não são suficientes para explicar a ocorrência de infecções severas e recorrentes nos pacientes com anemia falciforme, uma vez que estes fatores estão associados a infecções causadas por germes encapsulados e não explicam infecções por outras bactérias e por vírus.

Nos últimos anos, alguns trabalhos vêm propondo a hipótese que a anemia falciforme seria uma condição inflamatória crônica (Chies & Nardi, 2001). Belcher *et al.* (2000) verificaram que os monócitos de pacientes com anemia falciforme estão ativados e podem, por sua vez, ativar o endotélio, provocando o aumento na expressão de moléculas de adesão e de moléculas pró-coagulantes pelas células endoteliais. Segundo os autores, a resposta inflamatória mediada por estas moléculas poderia contribuir para a vaso-oclusão observada na anemia falciforme. Kaul & Hebbel (2000) demonstraram que episódios de hipoxia seguidos de reoxigenação induzem resposta inflamatória em camundongos transgênicos para anemia falciforme, mas não em camundongos normais. De fato, já havia sido reportado por Hebbel *et al.* (1980) e Hoover *et al.* (1979) que eritrócitos falcêmicos apresentam maior adesão a células endoteliais *in vitro*, e que a severidade das CVOs tem correlação com a aderência das células falcêmicas observada *in vitro*. Sendo assim, as CVOs poderiam ser provocadas, ou amplificadas, pela maior interação das hemácias falciformes com o endotélio vascular.

Em estudo que avaliou a capacidade proliferativa de células T e parâmetros hematológicos de pacientes com anemia falciforme em Porto Alegre (RS), C. Dresch (comunicação pessoal) observou que indivíduos homocigotos *SS* têm um índice de

proliferação (PI) maior que indivíduos controle AA, enquanto indivíduos SC apresentam valores de PI intermediários entre AA e SS. Considerando que o espectro clínico da anemia falciforme é mais severo em indivíduos SS do que em indivíduos SC, a autora sugeriu que a morbidade da doença pode estar associada com a capacidade proliferativa aumentada das células T observada naqueles indivíduos, o que refletiria o potencial inflamatório de cada um deles. Ainda neste estudo, o número de leucócitos e plaquetas mostrou-se aumentado tanto em pacientes SC quanto em SS (não-tratados com HU), em relação aos indivíduos controle AA, havendo associação entre contagens aumentadas e severidade da doença. Os valores aumentados de leucócitos encontrados para pacientes com anemia falciforme foram interpretados como resultado do desenvolvimento de um processo inflamatório crônico nestes indivíduos.

A associação de variantes polimórficas de genes relacionados ao sistema imune com o desenvolvimento da anemia falciforme parece ser uma abordagem bastante interessante para a caracterização desta doença. Analisando indivíduos com anemia falciforme provenientes de Porto Alegre e Recife, Chies & Hutz (2003) identificaram uma frequência aumentada do alelo *CCR5delta32* nestas populações. A proteína CCR5, codificada pelo gene *CCR5*, é um receptor de quimiocinas que participa na indução de respostas imunológicas mediadas por fagócitos, promovendo a migração destas células para locais de inflamação. O alelo *CCR5delta32* apresenta uma deleção de 32 pares de base que leva à perda de função da proteína. Assim, os autores sugeriram que esta variante nula poderia conferir uma vantagem a indivíduos com anemia falciforme, representada por inflamação menos frequente ou menos severa, levando ao aumento da expectativa de vida de indivíduos portadores da mutação.

A variante alélica *CCR5delta32*, bem como um polimorfismo no gene que codifica o receptor de quimiocinas CCR2, também foram estudados em pacientes com a doença de

Crohn, uma doença inflamatória intestinal crônica (Herfarth *et al.*, 2001). Os autores não observaram diferenças na frequência dos alelos mutantes (*CCR2-64I* e *CCR5delta32*) entre pacientes e indivíduos controle sadios, porém os resultados sugeriram que o alelo *CCR5delta32* poderia afetar o comportamento da doença e, desta forma, contribuir para a heterogeneidade clínica observada nesta condição.

O alelo mutante *CCR2-64I*, descrito por Smith *et al.* (1997), leva à substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 64 da proteína. Neste estudo, o alelo mutante apresentou frequência de 10% em caucasóides e de 15%, em Afro-americanos. Em pacientes japoneses, o genótipo homocigoto para o alelo mutante foi considerado protetor contra o desenvolvimento de esclerose múltipla convencional (Miyagishi *et al.*, 2003).

Smith *et al.* (1997) também reportaram que as variantes alélicas *CCR2-64I* e *CCR5delta32* estão em forte desequilíbrio de ligação na população norte-americana estudada, o que significa dizer que o alelo mutante para CCR5 ocorre em cromossomo contendo o alelo selvagem para CCR2 e o alelo mutante para CCR2, em cromossomo que possui o alelo selvagem para CCR5.

Considerando que os receptores de quimiocinas estão envolvidos em processo inflamatório, e trabalhando com a hipótese que a anemia falciforme é uma condição inflamatória crônica, analisamos os polimorfismos descritos para os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 em indivíduos portadores da doença e verificamos se há relação entre o quadro clínico e o genótipo dos pacientes.

1.6. ANEMIA FALCIFORME E ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL

Na anemia falciforme, a membrana dos eritrócitos sofre um crescente estresse oxidativo (Wetterstroem *et al.*, 1984; Rice-Evans *et al.*, 1986; van den Berg *et al.*, 1991). Este estresse oxidativo deve-se, em parte, à instabilidade da HbS (Chiu *et al.*, 1996). A

hemoglobina dos eritrócitos é considerada uma fonte significativa de geração de superóxidos devido ao compartilhamento de elétrons entre o radical heme e a molécula de oxigênio. A auto-oxidação da hemoglobina gera meta-hemoglobina e superóxido (Carrell *et al.*, 1975). A taxa fisiológica normal de formação de meta-hemoglobina fornece uma fonte contínua de produção de superóxido, o qual, por sua vez, gera peróxido de hidrogênio e oxigênio como subprodutos de dismutação. Foi observado que a taxa de auto-oxidação da hemoglobina oxigenada é 1,7 vezes mais rápida nas células falciformes que em eritrócitos normais, e que a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) é aproximadamente 2 vezes maior em eritrócitos falcêmicos que em hemácias normais (Hebbel *et al.*, 1982; Hebbel *et al.*, 1988).

O organismo produz óxido nítrico (NO), utilizando-o para a dilatação dos vasos sangüíneos e conseqüente manutenção de um fluxo adequado de sangue (Furchgott & Zawadzki, 1980; Rapoport & Murad, 1983). Quando o organismo desenvolve reparo de regiões vasculares que sofreram lesões, como ocorre no caso de vaso-oclusão em anemia falciforme, o NO evita que células inflamatórias associadas a este processo de reparo sofram adesão às células que revestem as artérias. O NO também reduz os processos de coagulação, pois interfere com a adesão plaquetária e está envolvido na estabilização dos superóxidos responsáveis pelos danos oxidativos, tanto em vasos quanto nos próprios eritrócitos.

Alterações no metabolismo de óxido nítrico têm sido descritas em pacientes falcêmicos (Morris *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2001). Uma análise recente mostrou que existem diferenças relativas ao sexo do paciente com anemia falciforme em relação à biodisponibilidade de óxido nítrico, tendo sido sugerido que este pode ser um dos mecanismos envolvidos na existência de diferentes padrões de morbidade e mortalidade relatados para homens e mulheres com anemia falciforme (Gladwin *et al.*, 2003). Dados

recentes também sugerem que a HU provoca um aumento na produção de óxido nítrico, sendo este aumento potencializado pela utilização simultânea de arginina (Morris *et al.*, 2003).

O óxido nítrico endotelial é sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), cujo gene *NOS3* encontra-se no cromossomo 7 humano (Marsden *et al.*, 1993).

Diferentes variantes polimórficas já foram descritas para o gene *NOS3*. Yoshimura *et al.* (1998) identificaram o polimorfismo E298D no éxon 7 do gene, que consiste na substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um ácido aspártico na posição 298 da proteína. Esta variante teve maior frequência em pacientes com espasmo coronariano e foi associada à maior susceptibilidade à doença coronariana no Reino Unido (Hingorani *et al.*, 1999). A mutação T⁻⁷⁸⁶C, por sua vez, ocorre na região promotora do gene, provocando a redução de sua expressão, e foi associada com angina e infarto do miocárdio (Nakayama *et al.*, 1999) e esclerose sistêmica (Fatini *et al.*, 2002). Um terceiro polimorfismo descrito para este gene consiste em um VNTR de 27-pb, cujo alelo selvagem (*4b*) apresenta 420-pb. O alelo variante *4a* foi associado positivamente com níveis plasmáticos de metabólitos de NO (nitrito e nitrato) e pressão sangüínea, em indivíduos Afro-americanos normotensos (Li *et al.*, 2004).

A distribuição destes polimorfismos genéticos foi estudada por Tanus-Santos *et al.* (2001) em 305 amostras de DNA provenientes de indivíduos classificados por etnia: 100 caucasóides, 100 Afro-americanos e 105 asiáticos. Os autores reportaram diferenças marcantes na distribuição das variantes de *NOS3*, nas frequências haplotípicas estimadas e na associação entre as variantes, entre os grupos étnicos estudados. Os alelos 298D e ⁻⁷⁸⁶C foram mais frequentes em caucasóides (34,5% e 42%, respectivamente) que em Afro-americanos (15,5% e 17,5%) e asiáticos (8,6% e 13,8%). O VNTR no íntron 4 apresentou

o alelo variante 4a (393-pb) com frequência mais alta em Afro-americanos (26,5%) que em caucasóides (16%) ou asiáticos (12,9%).

Considerando que uma síntese reduzida de óxido nítrico poderia levar a um acúmulo de alterações oxidativas, conseqüentemente predispondo a eventos vaso-oclusivos e/ou desenvolvimento de inflamação, cabe perguntar se existe correlação entre os polimorfismos descritos para eNOS e a morbidade associada à anemia falciforme. Dados disponíveis na literatura relacionando anemia falciforme e polimorfismos de eNOS se restringem ao estudo recente de Sharan *et al.* (2004), que reportaram a associação da variante T⁻⁷⁸⁶C com a presença de síndrome aguda do peito em mulheres portadoras de anemia falciforme.

A hipótese de inflamação crônica associada à anemia falciforme sugere que este estado seria o resultado do bloqueio dos vasos sangüíneos pelos eritrócitos falcêmicos, devido à sua deformação e sua maior adesão ao endotélio vascular (para revisão vide Hebbel, 1997). O que analisamos neste trabalho foi a possibilidade de que a atividade da eNOS em vasodilatação também esteja envolvida na propensão e/ou manutenção de um estado inflamatório crônico na anemia falciforme.

1.7. OBJETIVOS

Considerando o exposto anteriormente, e salientando a carência de dados na literatura referentes à correlação de polimorfismos descritos para óxido nítrico sintetase endotelial, para os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 e a patofisiologia da anemia falciforme, o presente trabalho teve como objetivos:

- Estabelecer a frequência de polimorfismos descritos para eNOS (E298D, T⁻⁷⁸⁶C e VNTR 4a) em um grupo de pacientes com anemia falciforme;
- Analisar uma possível correlação entre os polimorfismos de eNOS (E298D e T⁻⁷⁸⁶C e

VNTR 4a) e a morbidade associada à anemia falciforme;

- Estabelecer a frequência das variantes alélicas *CCR2-64I* e *CCR5delta32* neste grupo de pacientes; e
- Analisar uma possível correlação entre as variantes alélicas *CCR2-64I* e *CCR5delta32* e a morbidade associada à anemia falciforme, neste grupo de pacientes.

CAPÍTULO 2

Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease

Manuscrito em preparação a ser submetido à revista

Hemoglobin

Full title:

Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease

Short title:

CCRs and eNOS polymorphisms in SCD

Vargas AE¹, da Silva MAL², Silla L², Chies JAB¹

1. Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2. Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Corresponding author:

José Artur Bogo Chies

Department of Genetics, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15053

Zip code 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil.

Fax: +55-51-3316-7311.

E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is an inherited disorder that presents extremely variable clinical manifestations. It has been approached as an inflammatory disorder within the past decades and several works have tried to determine the factors involved in such characteristic. In order to contribute to the characterization of the genetic differences underlying this phenotypic diversity in SCD, we proposed to study the distribution of polymorphic variants of the genes encoding the chemokine receptors CCR2 and CCR5, as well as three polymorphisms in the *NOS3* gene, in Brazilian SCD patients. Our results indicate that the polymorphisms studied here are not directly associated to severe clinical manifestations in this group of SCD patients, although we observed a tendency for the development of a severe clinical course in carriers of some of the variant alleles studied. Further studies should be carried out in order to assess the role of such variants in the clinical picture of SCD.

Key words:

chemokine receptors, polymorphism, eNOS, sickle, hemoglobinopathy

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is an inherited disorder caused by a single nucleotide substitution (GAT→GTT) in the beta-globin gene (1). The hemoglobin molecule containing the mutant beta-globin chain (HbS) precipitates under hypoxia, altering the morphology of sickle red blood cells (SSRBCs), which become rigid. These rigid SSRBCs were for long thought to be the solely responsible for the vaso-occlusive episodes (or painful crisis), which are the hallmark of the disease and the main cause for hospitalizations of SCD patients, so that the clinical picture of the disease was attributed entirely to the genetic defect. However, as Embury (2) points out, only the production of HbS can be attributed to the sickle cell gene (*HBB*^S*), and there are numerous features of SCD that cannot be explained by this genetic characteristic. In fact, the clinical manifestations observed in SCD patients are extremely variable, although all of them present the same genetic mutation as the main cause for the disease (3). This clinical heterogeneity has been attributed to environmental and psychosocial as well as to genetic factors, such as fetal hemoglobin (HbF) levels, alpha-globin genotype and other epigenetic factors (2,4,5,6).

Vasooclusion (VO) is by far the main cause of the morbidity associated with SCD and its underlying mechanisms are still a debated issue (2,7). Several studies have demonstrated that the erythrocytes of SCD patients are more adherent to the endothelium and that such higher adhesiveness is involved in the vasoocclusive process (reviewed in 8). Furthermore, it has been observed that SCD patients present higher than normal white blood cell counts, which correlates with disease severity and could also contribute to VO (C. Dresch, personal communication; 9; reviewed in 10).

It has been proposed that SCD is a chronic inflammatory condition (11) and a growing number of works have been supporting this concept in the last years (reviewed in

8). The question arising with such idea is whether inflammation causes complications in SCD, or results from them (8). It was proposed that the high white blood cell counts observed in SCD patients could be interpreted as the result of a chronic inflammatory state in those individuals (11). In addition, SCD patients present elevated levels of inflammatory mediators, such as IL-6 and TNF-alfa, and of adhesive molecules (reviewed in 8). Studies using murine models of SCD are also indicative of a pro-inflammatory state, showing that transgenic sickle mice have an active inflammatory response when submitted to hypoxia-reoxygenation, which does not happen in normal mice (12,13).

The current concept of SCD as an endothelial disease suggests that genetic differences in endothelial function could help govern its astonishing phenotypic diversity (8). In order to contribute to the characterization of the genetic differences underlying this phenotypic diversity in SCD, we proposed to study the distribution of allele variants of the genes encoding the chemokine receptors *CCR2* (*CCR2-64I*) and *CCR5* (*CCR5delta32*), both involved in leukocyte migration to inflamed tissues, in a sample of SCD patients from Porto Alegre (in the southern region of Brazil). We have also studied three well-characterized polymorphisms in the *NOS3* gene, which encodes the enzyme that produces nitric oxide (NO) in platelets and endothelial cells (endothelial nitric oxide synthetase, eNOS), in order to investigate whether eNOS variants could have any effects in the suggested chronic inflammatory state in SCD, since NO is pro-inflammatory at low concentrations by inducing vasodilatation and the recruitment of neutrophils (14). Observed genotypes, gender and clinical data - concerning pain rate (number of painful crisis per year), incidence of infections and cardiac and/or vascular complications - for each patient, were then correlated.

MATERIALS & METHODS

Patients and controls

We have investigated seventy-three (73) *SS* patients (35 males and 38 females) being followed up in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a public health institution. Blood was collected in BD Vacutainer® Plus K2EDTA tubes (BD Diagnostics, NJ, USA) and stored at 4°C until manipulation. Informed consent was obtained either from patients or their legal representative. Patients were either Afro-Brazilians or admixed. In the present work, the term Afro-Brazilian designates phenotypically black Brazilian individuals. The term Afro-American refers to phenotypically black North-American individuals. This nomenclature does not consider the individuals ancestry, but rather their skin color. Female patient age ranged from 5 to 58 years old, while male patient age range was 3 to 69 years old. *HBB*S* homozygosity was confirmed by molecular diagnosis as described elsewhere (15). Healthy Afro-Brazilian individuals from Porto Alegre (CCR2, CCR5 and VNTR4a polymorphisms) or Rio de Janeiro (T⁻⁷⁸⁶C and E298D; data kindly provided by K. dos Santos, personal communication) were analyzed as controls. This project was approved by the HCPA ethics committee.

Definition of clinical events

Patients were considered to have a severe clinical course when presenting 2 or more painful events per year (pain rate \geq 2) and incidence of cardiac and/or vascular complications. A moderate clinical course was defined as incidence of 1 painful episode per year or less (pain rate \leq 1) and absence of cardiac and/or vascular complications. This classification was based on the period before the patients went on hydroxyurea (HU) treatment. Patients with a severe clinical course presented recurrent infections (specially pneumonia), in addition to a pain rate of 2 or more painful episodes per year.

DNA extraction

DNA was isolated from peripheral blood cells using the protocol described by Lahiri and Nurnberger (16). Samples were stored at -20°C.

CCR2 and CCR5 genotyping

CCR2 and CCR5 genotyping were performed using specific primers previously described by Smith *et al.* (17) and Chies & Hutz (18), respectively. PCR samples were prepared to a final volume of 25ul as follows: 1ul of DNA (0,2-0,5ug), 2,5ul of 10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 1ul of 50mM MgCl₂, 1ul of 3mM dNTP mix, 1ul of 10pmol primer mix and 0,2ul *Taq* DNA polymerase 5U/ul (Invitrogen Corporation, California, USA). The PCR reaction mixtures underwent 40 cycles at 94°C for 1 min for denaturation, 55°C for 1 min for annealing, and 72°C for 1 min for extension. The CCR2 resulting 128-bp fragment was digested with 3U of the enzyme *Bsa*BI for 3h at 60°C, producing 110-bp and 18-bp fragments (*CCR2-64I* allele) or a single undigested 128-bp fragment (wild-type allele), which were visualized in a 3% agarose gel stained with ethidium bromide. The CCR5 PCR produces a 137-bp fragment (wild type) or a 102-bp fragment (*CCR5delta32* allele), and samples were directly visualized in a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

NOS 3 genotyping

The T⁻⁷⁸⁶C point variation at the promoter region was analyzed employing the specific primers described in González Ordóñez *et al.* (19). PCR samples were prepared as described above and underwent 35 cycles at 98°C for 35 sec, 62°C for 50 sec, and 72°C for 50 sec. The amplified 180-bp fragment was then digested with *Msp*I (for 4h at 37°C), producing 140 bp and 40 bp fragments (wild-type *T* allele) or 90-bp, 50-bp and 40-bp fragments (variant ⁻⁷⁸⁶C allele). Resulting fragments were visualized in 3% agarose gel.

The missense variant E298D in exon 7 was identified using the set of primers

described in Shimasaki *et al.* (20). PCR samples were prepared as described above and were submitted to 35 cycles at 94°C for 1 min, 58°C for 1min, and 72°C for 1 min. The resulting 248-bp fragment was digested with the enzyme *Eco24I* (for 3h at 37°C), yielding 163-bp and 85-bp fragments (wild-type *E* allele) or no digestion (variant *298D* allele), as visualized in 3% agarose gel.

The variable number of tandem repeats (VNTR) in intron 4 was detected using the specific primers described in Li *et al.* (21). PCR samples were prepared as described above and were submitted to 34 cycles at 95°C for 25 sec, 56°C for 35 sec, and 72°C for 40 sec. The 447-bp, 420-bp and 393-bp fragments (corresponding to alleles *4y*, *4b* and *4a*, respectively) were directly visualized in 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Statistical methods

Genotype distributions were determined by counting. Allele and genotype frequencies were compared by Fisher's exact test probabilities. Statistical significance was defined as a P-value <0.05.

RESULTS

The genotype and allele distributions observed in SCD patients and controls analyzed here are shown in Table 1. There were no statistically significant differences between variant allele frequencies in patients and controls ($1 \geq P \geq 0.19$). The VNTR *4y* allele was found only among controls, in heterozygotes *4y/4b* (n=2).

When we analyzed the genotype and allele frequency distribution by gender in our group of patients (Table 2 and Table 3, respectively), we observed a significant difference in the distribution of CCR2 genotypes, and *CCR2-64I* and VNTR *4a* alleles, among males and females. Male patients presented a higher frequency of the VNTR *4a* variant allele when compared to female patients (P=0.04). Female patients, in turn, had a higher frequency of the *CCR2-64I* allele in comparison to male patients (P=0.03).

We did not observe significant differences in the distribution of allele variants between patients with severe clinical course and those considered to have a moderate clinical course (data not shown).

DISCUSSION

The chemokine receptors CCR2 and CCR5 are mainly found in cells of the immune system, such as macrophages and T lymphocytes, playing a major role in the migration of these cells to sites of inflammation. The variant allele *CCR5delta32* contains a 32bp deletion that generates a truncated protein (22,23) and has been extensively studied in the last years for providing relative resistance to infection by HIV-1. The mutant allele *CCR2-64I* generates a protein with an isoleucine residue in position 64, instead of the valine residue found in the wild-type protein, and it seems to be associated with a delayed AIDS onset in HIV-1-infected individuals (17). Several studies have attempted to describe the role of these polymorphisms in inflammatory diseases (24-31), transplant loss (32) and hypertension (33).

Interestingly, it has been reported that human smooth muscle cells express a number of functional chemokine receptors (34,35). Considering that, one could speculate the implications that inactivating mutations in those receptors (e.g. the *CCR5delta32*) could exert in vascular disorders, such as SCD.

In the present study, the distribution of the *CCR5delta32* allele variant was not significantly different between patients and controls, which is in contrast to previously reported data suggesting a protective role of that variant allele for SCD carriers (18).

Our results suggest that the variant alleles *CCR2-64I* and *CCR5delta32* are not directly associated to the development of a severe clinical course in the group of patients studied here. We did not find any homozygotes for the *CCR5delta32* allele variant, and the number of heterozygotes was small (n=4), which is an expected feature for an African-derived population since this mutation has an European origin. Interestingly, however, the variant allele *CCR5delta32* is present only in the group of patients with a severe clinical course when pain rate is concerned (data not shown). Likewise, the only patient that is

homozygote for the variant allele *CCR2-64I* is in the group of patients with 2 or more painful episodes per year (data not shown). In spite of the absence of statistical difference between the two groups of patients, these observations might suggest a tendency for SCD patients who carry the variant alleles *CCR2-64I* and *CCR5delta32* to develop a more severe clinical course. Further studies need to be carried out in order to establish in which manner these polymorphisms could influence the clinical picture of SCD.

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthetases (NOS), playing an essential role in the regulation of blood flow and pressure. Other physiologic roles of NO include inhibition of platelet aggregation and adhesion, as well as interference with leukocyte adhesion to the endothelium (reviewed in 36).

Alterations in the NO metabolism have been described in SCD patients, suggesting a relationship between the L-arginine-NO pathway and VO (37,38). In addition, a recent work showed that NO bioavailability and NO responsiveness are greater in women than in men with SCD, providing a possible mechanism for reported sex differences in sickle cell disease morbidity and mortality (39). Recent data have demonstrated that HU (used in SCD treatment for its predicted capacity to induce HbF synthesis) increases the production of NO and that such effect is augmented by co-administration of arginine (40; reviewed in 41).

Several polymorphic variants have been described in the eNOS-encoding gene, *NOS3*. The polymorphisms we analyzed have been inconsistently associated with cardiovascular diseases, possibly because such associations could be population and disease specific (42), or due to a differential distribution of eNOS variants among ethnic groups (43).

The T⁻⁷⁸⁶C mutation seems to produce a significant reduction in eNOS gene promoter activity (44), while the D substitution at 298 does not seem to have a major effect

in modulating eNOS activity *in vivo* (45). The occurrence of variants in the promoter region or in exon 7, but not in intron 4, were associated with lower levels of platelet-derived NO (46).

Considering that an impaired NO bioavailability could lead to the accumulation of oxidative alterations, consequently predisposing to VO and/or inflammation, one might ask if there are any correlations between the described eNOS polymorphisms and the morbidity associated with SCD. Published data concerning eNOS polymorphisms in SCD patients are restricted to the recent study by Sharan *et al.* (47), which reports the association of the T⁻⁷⁸⁶C polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in female SCD patients.

Our data concerning the distribution of *NOS3* gene polymorphisms indicate the absence of significant differences between patients and controls, as well as between the group of patients with a severe clinical course and those with a moderate clinical course.

Nevertheless, it is important to point out that all the patients who are homozygotes for the ⁻⁷⁸⁶C variant (n=4) in our sample presented a severe clinical course when pain rate was considered (data not shown). Such observations could be suggestive of an important role for this variant in the development of a severe clinical course in the SCD patients studied here.

Most of the patients analyzed in this work are on HU treatment (n=60), and they have shown a significant improvement in the clinical course of the disease even though not all of them responded with augmented HbF levels (data not shown). Apart from increasing HbF levels, HU has demonstrated to act as a source of NO. SCD patients on HU show significant increases in the levels of NO metabolites, cGMP and HbF (reviewed in 41).

Among the individuals in our sample, we observed a male patient with alpha-thalassemia who presented a severe clinical course before going on HU treatment. After he

started taking HU, his clinical course improved significantly, in spite of the small increase in his HbF levels (from 0.9% before HU, to 1.3% after the treatment). This patient is homozygote for the variant alleles in the *NOS3* gene promoter (*CC*) and exon 7 (*DD*), and he is heterozygote for the VNTR in intron 4 (*4b/4a*). The alpha-thalassemia effects in the clinical picture of SCD are still a controversial issue concerning VOCs (4). In the present case it does not seem to have had any beneficial effects as judged by the severe clinical course the patient had before HU treatment began. The homozygosity for the variants which showed significant functional effects in the *NOS3* gene, reducing its promoter activity (44) and lowering the levels of platelet-derived NO (46), could be involved in the development of the severe clinical picture observed in this patient, if we assume that a reduced NO bioavailability could predispose to VOCs and/or inflammation. Since, in this case, the beneficial effects of HU cannot be attributed to an elevation in HbF levels, we could suggest that HU might be influencing the clinical picture observed in this patient through the maintenance of adequate NO levels, which were probably low before the treatment if we consider the individual's genotypes.

In conclusion, our results concerning the polymorphisms *CCR2-64I*, *CCR5delta32* and those in the *NOS3* gene demonstrate that such mutations are not directly associated to the development of a severe clinical course in the sample of SCD patients. Nevertheless, we found that patients who carry the alleles *CCR2-64I* (in homozygosity) or *CCR5delta32* (in heterozygosity), as well as those who are homozygotes for the ⁻⁷⁸⁶*C* variant, show a tendency to develop a severe clinical course. Such observations imply that more research need to be carried out, in larger samples and concerning other severity markers in SCD, in order to establish the role of such variants in the modulation of the clinical picture in this disorder.

REFERENCES:

1. Marotta CA, Wilson JT, Forget BJ, Weissman SM. Human β -globin messenger RNA III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *J Biol Chem.* 1977;252:5040-5051.
2. Embury SH. The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation.* 2004;11:101-113.
3. Ballas SK, Mohandas N. Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation.* 2004;11:209–225.
4. Ballas SK. Effect of α -globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2001;20:107-121.
5. Serjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2001;112:3-18.
6. Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin Hematol.* 2001;38:299-306.
7. Frenette PS. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. *Microcirculation.* 2004;11:167-177.
8. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation.* 2004;11:129-151.

9. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF *et al.* Mortality in sickle cell disease – Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994;330(23):1639-1644.
10. Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev.* 2004;18:65-73.
11. Chies JAB, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001;57(1):46-50.
12. Kaul DK, Hebbel RP. Hipoxia/reoxigenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest.* 2000;106(3):411-420.
13. Belcher JD, Bryant CJ, Nguyen J *et al.* Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood.* 2003;101:3953-3959.
14. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(8):1397-1406.
15. Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ *et al.* Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao.* 1989;16(6):475-482.
16. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5444.

17. Smith MW, Dean M, Carrington M *et al.* Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science*. 1997;277:959-965.
18. Chies JAB, Hutz MH. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(1):71-75.
19. González Ordóñez AJ, Fernández Carreira JM, González Franco A, Martín Sánchez L, Alvarez MV, Coto García E. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron 4, 27 bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2000;99(6):563-566.
20. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M *et al.* Association of the missense E298D variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1506–1510.
21. Li R, Lyn D, Lapu-Bula R *et al.* Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens*. 2004;17:560-567.
22. Liu R, Paxton WA, Choe S *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86:367-377.
23. Samson M, Libert F, Doranz BJ *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian

individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382:722-725.

24. Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. Association of CCR5 delta-32 with reduced risk of asthma. *Lancet*. 1999;354:1264-1265.

25. Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Jinushi E, Ito A, Kawakami Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):2021-2023.

26. Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Tashiro K. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003;145:135-138.

27. Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC, Alvarez V. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2000;1(4):288-289.

28. Bayley JP, Baggen JM, van der Pouw-Kraan T, Crusius JB, Huizinga TW, Verweij CL. Association between polymorphisms in the human chemokine receptor genes CCR2 and CX3CR1 and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*. 2003;62(2):170-174.

29. Herfarth H, Pollok-Kopp B, Goke M, Press A, Oppermann M. Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Crohn's disease. *Immunol Lett*. 2001;77(2):113-117.

30. Eri R, Jonsson JR, Pandeya N *et al.* CCR5-Delta32 mutation is strongly associated with primary sclerosing cholangitis. *Genes Immun.* 2004;5(6): 444-450.
31. Bursill CA, Channon KM, Greaves DR. The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15(2):145-149.
32. Fischereder M, Luckow B, Hoher B *et al.* CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet.* 2001;357:1758-1761.
33. Mettimano M, Specchia ML, Ianni A *et al.* CCR5 and CCR2 gene polymorphisms in hypertensive patients. *Br J Biomed Sci.* 2003;60(1):19-21.
34. Schechter AD, Calderon TM, Berman AB *et al.* Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5. *J Biol Chem.* 2000;275(8):5466-5471.
35. Schechter AD, Berman AB, Taubman MB. Chemokine receptors in vascular smooth muscle. *Microcirculation.* 2003;10:265-272.
36. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-2012.
37. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest

syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22(6):515-520.

38. Sullivan KJ, Kissoon N, Duckworth LJ *et al.* Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS I gene is associated with acute chest syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:2186–2190.

39. Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP *et al.* Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation.* 2003;107:271-278.

40. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J *et al.* Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25(8):629-634.

41. King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(6):737-744.

42. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab.* 2000;70(4):241-251.

43. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):719-725.

44. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M *et al.* T⁻⁷⁸⁶→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm.

Circulation. 1999;99:2864-2870.

45. McDonald DM, Alp NJ, Channon KM. Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase E298D polymorphic variants in human endothelial cells. *Pharmacogenetics*. 2004;14(12):831-839.

46. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR *et al*. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*. 2002;12(5):407-413.

47. Sharan K, Surrey S, Ballas S *et al*. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2004;124(2):240-243.

TABLE 1: Genotype and allele distributions in patients and controls.

CCR2					
	<i>CCR2/CCR2</i>	<i>CCR2/64I</i>	<i>64I/64I</i>	<i>64I</i>	
Patients (n=72)	49 (0.68)	22 (0.30)	1 (0.01)	0.17	
Controls (n=87)	67 (0.77)	20 (0.23)	absent	0.11	
<i>P</i>	0.24			0.19	
CCR5					
	<i>CCR5/CCR5</i>	<i>CCR5/delta32</i>	<i>delta32/delta32</i>	<i>delta32</i>	
Patients (n=73)	69 (0.94)	4 (0.05)	absent	0.03	
Controls (n=58)	57 (0.98)	1 (0.02)	absent	0.008	
<i>P</i>	0.38			0.39	
T-786C					
	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>-786C</i>	
Patients (n=73)	51 (0.70)	18 (0.25)	4 (0.05)	0.18	
Controls (n=100)	67 (0.67)	27 (0.27)	6 (0.06)	0.19	
<i>P</i>	0.93			0.78	
E298D					
	<i>EE</i>	<i>ED</i>	<i>DD</i>	<i>298D</i>	
Patients (n=73)	54 (0.74)	16 (0.22)	3 (0.04)	0.15	
Controls (n=100)	72 (0.72)	25 (0.25)	3 (0.03)	0.15	
<i>P</i>	0.83			1	
VNTR					
	<i>4y/4b</i>	<i>4b/4b</i>	<i>4b/4a</i>	<i>4a/4a</i>	<i>4a</i>
Patients (n=73)	absent	38 (0.52)	30 (0.41)	5 (0.07)	0.27
Controls (n=90)	2 (0.02)	50 (0.55)	33 (0.37)	5 (0.05)	0.24
<i>P</i>	0.67				0.70

Genotype frequencies were compared using Fisher's exact test (P=0.05). For statistical analysis, the VNTR variant alleles *4y* and *4a* were grouped together.

TABLE 2: Distribution of patients by genotype and gender

	<i>AA (M/F)</i>	<i>Aa (M/F)</i>	<i>aa (M/F)</i>	<i>N (M/F)</i>	<i>P</i>
T ⁻⁷⁸⁶ C (promoter)	51 (23/28)	18 (9/9)	4 (3/1)	73 (35/38)	0.51
E298D (exon 7)	54 (25/29)	16 (8/8)	3 (2/1)	73 (35/38)	0.83
VNTR (intron 4)	38 (14/24)	30 (17/13)	5 (4/1)	73 (35/38)	0.11
CCR2	48 (28/20)	23 (7/16)	1 (absent/1)	72 (35/37)	0.0319
CCR5	69 (34/35)	4 (1/3)	absent	73 (35/38)	0.61

AA, Aa and aa correspond to the following genotypes: *TT, TC and CC* (promoter); *EE, ED and DD* (exon 7); *4b/4b, 4b/4a and 4a/4a* (intron 4); *CCR2/CCR2, CCR2/64I and 64I/64I* (CCR2); *CCR5/CCR5, CCR5/delta32 and delta32/delta32* (CCR5).

M/F = males/females.

Frequencies were compared using Fisher's exact test (P=0.05).

TABLE 3: Distribution of patients by allele frequency and gender

	<i>64I</i>	<i>delta32</i>	⁻⁷⁸⁶ <i>C</i>	<i>298D</i>	<i>4a</i>
Male	0.10	0.01	0.21	0.17	0.35
Female	0.24	0.04	0.14	0.13	0.20
<i>P</i>	0.03	0.62	0.29	0.64	0.04

Frequencies were compared using Fisher's exact test (P=0.05).

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO

“We live in an essential and unresolvable tension between our unity with nature and our dangerous uniqueness. Systems that attempt to place and make sense of us by focusing exclusively either on the uniqueness or the unity are doomed to failure. But we must not stop asking and questioning because the answers are complex and ambiguous. We can do no better than to follow Linnaeu's advice, embodied in his description of Homo sapiens within his system. He described other species by the numbers of their fingers and toes, their size and their color. For us, in place of anatomy, he simply wrote the Socratic injunction: Know thyself.”

Stephen Jay Gould
(Hen's Teeth and Horse's Toes)

Os estudos iniciais acerca das características clínicas da anemia falciforme buscavam explicar a maior susceptibilidade a infecções observada nestes pacientes através de defeitos em seu sistema imune, tal como a hipofunção esplênica, atribuída à recorrência de eventos vaso-oclusivos no baço e à sobrecarga do órgão causada pelo aumento da eritrofagocitose (revisado em Barret-Connor, 1971). As demais características clínicas marcantes da anemia falciforme podiam ser simplesmente explicadas pela presença dos eritrócitos falcêmicos que, tendo tempo de vida reduzido e provocando o bloqueio dos vasos sanguíneos, eram considerados os responsáveis pela anemia severa e pelas crises de dor que caracterizam a doença. Em suma, todo o quadro clínico da anemia falciforme era justificado com base na presença de uma mutação genética (*HBB* S*), a qual era responsável pela geração de uma hemoglobina defeituosa (HbS) que, por sua vez, desencadeava todos os problemas característicos da doença.

À medida em que avançamos no entendimento da anemia falciforme, porém, percebemos que esta hemoglobinopatia se apresenta como uma doença complexa, na qual o defeito genético e suas conseqüências diretas não são suficientes para explicar a ampla heterogeneidade do quadro clínico observada nos pacientes portadores do alelo *HBB* S* . Além de fatores ambientais, um número crescente de fatores genéticos vêm sendo relacionados a diferentes aspectos da expressão clínica da anemia falciforme. O haplótipo associado ao alelo mutante (Nagel *et al.*, 1985; Kulozik *et al.*, 1987; Ramana *et al.*, 2000), os níveis de HbF (Hutz & Salzano, 1983; Platt *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997) e a concomitância de alfa-talassemia (Ballas, 2001) são alguns exemplos de fatores genéticos que seguramente modulam o quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme.

Uma abordagem mais ampla da anemia falciforme permitiu formular a hipótese que esta seria uma condição inflamatória crônica. Com estudos iniciais *in vitro* da década de 80, que demonstraram a maior adesão das células falcêmicas ao endotélio (revisado por

Hebbel, 1997), seguidos de trabalhos em modelos murinos mostrando a ocorrência de inflamação em camundongos transgênicos submetidos a hipoxia, e passando por ensaios com monócitos, leucócitos e mediadores de inflamação em pacientes falcêmicos (revisado por Hebbel *et al.*, 2004), chegou-se ao conceito atual da anemia falciforme, onde as interações entre eritrócitos falcêmicos, leucócitos e endotélio servem como base para explicar as características clínicas desta doença.

Neste contexto, e com a intenção de contribuir na busca de características genéticas que possam estar envolvidas na modulação do quadro clínico heterogêneo da anemia falciforme, estudamos polimorfismos de genes que estão envolvidos em processos inflamatórios. Foram alvo deste trabalho os polimorfismos de receptores de quimiocinas CCR2-64I e CCR5delta32, bem como três polimorfismos identificados no gene *NOS3*, que codifica a enzima eNOS.

O gene do receptor de quimiocina CCR5 começou a ser estudado avidamente nos anos 90, quando verificou-se que a variante alélica *CCR5delta32* confere relativa resistência à infecção por HIV-1. O vírus utiliza a molécula CCR5 (presente em células do sistema imune) como co-receptor para entrar nas células que infecta e, portanto, qualquer variante nula deste gene que culmine na ausência da molécula na superfície celular (tal como a deleção *CCR5delta32*) potencialmente impede a entrada do vírus na célula-alvo. Com o mesmo interesse, nesta mesma época, iniciaram-se estudos de variantes em outros genes da família dos receptores de quimiocinas, como o *CCR2-64I* (Smith *et al.*, 1997), cuja influência na progressão da AIDS ainda não está totalmente esclarecida.

Os polimorfismos CCR2-64I e CCR5delta32 foram estudados em diferentes doenças inflamatórias, tais como esclerose múltipla (Miyagishi *et al.*, 2003), artrite reumatóide (RA) (Zapico *et al.*, 2000; Bayley *et al.*, 2003), doença de Crohn (CD) (Herfarth *et al.*, 2001), arteriosclerose (Bursill *et al.*, 2004) e asma (Hall *et al.*, 1999), porém o papel

desempenhado por eles nestas enfermidades ainda não está completamente elucidado. Na Figura 1 (Anexo 4) ilustramos a genotipagem de pacientes com anemia falciforme para ambos os polimorfismos.

Demonstrou-se, no entanto, que o papel de CCR5 em dano cerebral induzido pela substância tóxica ácido cáinico, em camundongos nocaute (CCR5 KO), é compensado pelo aumento da expressão de CCR2 e CCR3, os quais compartilham o ligante MCP-2 com CCR5 (Chen *et al.*, 2003). Além disso, camundongos deficientes em CCR5 (CCR5^{-/-}) demonstraram taxas de mortalidade aumentadas associadas a pneumonia aguda, enquanto camundongos CCR2^{-/-} foram protegidos contra as manifestações patológicas da influenza devido ao recrutamento defectivo de macrófagos (Dawson *et al.*, 2000). Estas evidências sugerem, então, que: a) a ausência de um receptor de quimiocina (no caso, CCR5) pode ser compensada pelo aumento da expressão de outros receptores da mesma família (CCR2 e CCR3, por exemplo); e b) os papéis desempenhados por CCR2 e CCR5 em processo infeccioso podem ser diferentes, ou até mesmo antagônicos.

Em nossa amostra de pacientes com anemia falciforme, não foram observadas diferenças significativas nas distribuições genotípica e alélica, entre pacientes e controles, ou entre os grupos de pacientes com quadro clínico severo e quadro clínico moderado, para ambos os receptores de quimiocinas estudados (Anexo 3, Tabelas A a D). Houve diferença significativa entre as frequências do alelo CCR2-64I observadas em pacientes homens e mulheres (P=0.03). Não foram identificados indivíduos homozigotos para alelo defectivo CCR5delta32, o que seria de se esperar se considerarmos que esta mutação é de origem européia e a amostra de pacientes se constitui de Afro-brasileiros e miscigenados. O número de pacientes heterozigotos para CCR5delta32 nesta amostra (n=4) foi bastante reduzido, porém todos eles fizeram parte do grupo de pacientes com quadro clínico severo da doença, quando consideramos a *pain rate*. Para o alelo CCR2-64I, identificou-se apenas

1 (um) indivíduo homozigoto, o qual é homozigoto para o alelo *CCR5* selvagem e apresentou quadro clínico considerado severo (3-4 crises de dor por mês, ocorrência de AVC, infecção renal, várias internações hospitalares) antes do início do tratamento com HU. Identificou-se apenas 2 (dois) pacientes heterozigotos para ambos os alelos variantes em questão, os quais apresentavam quadro clínico severo com histórico de infecções (pneumonia e outras) e *pain rate* elevada, antes do início do tratamento com HU.

Considerando nossos dados e o exposto anteriormente, pode-se sugerir que: a) os alelos *CCR2-64I* e *CCR5delta32* não fornecem vantagem seletiva direta para os indivíduos com anemia falciforme, nesta amostra de pacientes, uma vez que não houve diferença significativa na distribuição dos alelos variantes entre pacientes e controles, o que difere dos dados observados para *CCR5delta32* por Chies & Hutz (2003); b) apesar da ausência de diferença significativa na distribuição dos alelos variantes entre pacientes com quadros clínicos severo e moderado da doença, o alelo *CCR5delta32* parece estar relacionado à expressão de um quadro clínico mais grave, considerando que todos os pacientes heterozigotos desta amostra fizeram parte do grupo com quadro clínico severo. Talvez se estivéssemos lidando com uma amostra maior de pacientes este efeito deletério do alelo *CCR5delta32* fosse evidenciado, pois observamos um número bem maior de pacientes com quadro clínico severo (n=57) do que aqueles com quadro considerado moderado (n=14), o que pode ter influenciado na análise estatística dos dados entre os grupos. O mesmo poderia ser dito a respeito do fato de que o único paciente homozigoto para o alelo *CCR2-64I* foi encontrado no grupo de pacientes com quadro clínico severo; c) o efeito deletério dos alelos variantes não pôde ser detectado (não houve diferença estatística entre pacientes e controles sadios) porque a presença de outros receptores de quimiocinas supre a ausência ou deficiência dos receptores estudados aqui; e d) o quadro pró-inflamatório em pacientes com anemia falciforme talvez seja modulado por um conjunto de fatores que inclui os

receptores de quimiocinas, porém analisando somente estes parâmetros não é possível estabelecer com exatidão seu papel nesta doença.

Se os receptores de quimiocinas são importantes no estabelecimento do padrão inflamatório observado na anemia falciforme, seria interessante analisar outros polimorfismos relevantes, nestes e em outros receptores de quimiocinas (além de estabelecer a relação de ligação entre os polimorfismos, na população estudada), bem como a expressão dos ligantes a estes receptores, para uma conclusão mais acurada sobre a associação entre a doença e estas variáveis. Cabe ressaltar, ainda, que o alelo *CCR5delta32* é uma variante nula, enquanto o alelo *CCR2-64I* parece não apresentar diferenças funcionais quando comparado ao alelo selvagem *in vitro*: a proteína mutante não diferiu significativamente daquela selvagem quanto às funções de co-receptor para HIV-1 e receptor de quimiocina, ou quanto ao efeito sobre as funções dos receptores CCR3, CCR5 e CXCR4 (Lee *et al.*, 1998).

Os polimorfismos no gene da enzima eNOS analisados neste trabalho têm sido associados de maneira controversa a doenças cardiovasculares. Segundo Wang & Wang (2000) esta inconsistência de dados deve-se à possibilidade que tais associações poderiam ser população- e doença-específicas. Poderia-se, ainda, atribuir tais resultados controversos a diferenças étnicas na distribuição destas variantes, conforme demonstrado por Tanus-Santos *et al.* (2001).

Estudos funcionais indicam que a mutação T⁻⁷⁸⁶C produz uma redução significativa na atividade do promotor do gene da eNOS (Nakayama *et al.*, 1999), enquanto a substituição no éxon 7 (E298D) parece não exercer um efeito importante na modulação da atividade da enzima *in vivo* (McDonald *et al.*, 2004). Além disso, a ocorrência das variantes no promotor ou no éxon 7, mas não aquela no íntron 4, foram associadas a níveis mais baixos de NO derivado de plaquetas (Tanus-Santos *et al.*, 2002). A Figura 2 (Anexo

4) ilustra a genotipagem para o VNTR em pacientes com anemia falciforme e controles sadios deste trabalho.

Até o presente, o único estudo que relaciona polimorfismos de eNOS e anemia falciforme demonstrou a associação do polimorfismo T⁻⁷⁸⁶C com susceptibilidade aumentada para ACS em pacientes do sexo feminino (Sharan *et al.*, 2004).

Os nossos dados referentes à distribuição dos polimorfismos no gene da enzima eNOS indicam ausência de diferenças significativas entre pacientes e controles, bem como entre pacientes com quadro clínico severo e aqueles com quadro moderado (Anexo 3, Tabelas A a D). É interessante notar, porém, que todos os pacientes homocigotos para o alelo variante ⁻⁷⁸⁶C (n=4) observados nesta amostra apresentaram quadro clínico severo quando observado o parâmetro de *pain rate*. Considerando os estudos funcionais que reportam o papel importante desta variante para o funcionamento do promotor do gene *NOS3* (Nakayama *et al.*, 1999), pode-se sugerir que a redução nos níveis da enzima provocada pela presença do alelo ⁻⁷⁸⁶C em homocigose estaria contribuindo para o desenvolvimento de um quadro clínico severo nos pacientes com anemia falciforme desta amostra.

Dados recentes demonstram que a HU aumenta a produção de NO e que este efeito é potencializado pela co-administração de arginina (Morris *et al.*, 2003; revisado em King, 2004). A maioria dos pacientes analisados no presente trabalho está sob tratamento com esta droga citotóxica (n=60), e estes apresentaram uma melhora sensível do quadro após o início deste tratamento, representada pela redução ou extinção de crises de dor e de infecções, mesmo quando não houve aumento significativo dos níveis séricos de HbF (dados não apresentados). Dentre estes casos, destaca-se um indivíduo com anemia falciforme e alfa-talassemia que apresentou quadro severo até o tratamento com HU (crises de dor frequentes - 1-2 crises por mês, infecções urinárias e pneumonia, além de várias

internações hospitalares) e cujo quadro clínico melhorou sensivelmente após o início do tratamento (ausência de infecções e nenhuma internação hospitalar), apesar do pequeno incremento em seu nível de HbF (0,9% antes da HU; 1,3% após o início do tratamento). Este paciente do sexo masculino apresenta genótipos homocigotos para as variantes presentes no promotor (CC) e no éxon 7 (DD) do gene *NOS3*, e é heterocigoto para o VNTR do íntron 4 (4b/4a). O efeito da alfa-talassemia no quadro clínico da anemia falciforme é controverso no que se refere a episódios de crises de dor (Ballas, 2001), e neste caso parece não ter tido efeito benéfico a julgar pela gravidade do quadro clínico antes do tratamento com HU. A homocigose para as variantes que apresentaram efeitos funcionais significativos na atividade do promotor de *NOS3* (Nakayama *et al.*, 1999) e na produção de NO por plaquetas (Tanus-Santos *et al.*, 2002), poderia contribuir para o desenvolvimento do quadro clínico severo (considerando a incidência de infecções e o número de eventos de dor por ano) observado neste paciente antes do tratamento com HU, assumindo que alterações na biodisponibilidade de NO poderiam predispor a eventos vasocclusivos e/ou desenvolvimento de inflamação. Pode-se sugerir, portanto, que neste paciente a HU estaria modulando o quadro clínico através da manutenção de níveis adequados de NO, os quais provavelmente estavam prejudicados anteriormente pelas características genóticas do indivíduo, uma vez que o efeito benéfico da HU neste caso não pode ser atribuído ao aumento significativo no nível de HbF.

Nossos resultados indicam que os polimorfismos analisados não estão significativamente associados ao desenvolvimento de um quadro clínico severo nos pacientes estudados. A ausência de diferença estatística na distribuição das frequências alélicas entre pacientes e indivíduos controle sugere que estes polimorfismos não conferem vantagem seletiva aos portadores com anemia falciforme presentes nesta amostra. No entanto, observamos que a presença das variantes alélicas *CCR2-64I* (em homocigose) ou

CCR5delta32 (em heterozigose), bem como do alelo ⁻⁷⁸⁶C em homozigose, confere aos pacientes uma tendência a desenvolver um quadro clínico mais severo. Estas observações demandam que novos estudos sejam conduzidos, em amostras maiores e incluindo outros marcadores de severidade da anemia falciforme, no intuito de se estabelecer o papel destas variantes na modulação do quadro clínico desta doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abbas AK, Lichtman AH and Pober JS (2000) Cellular and Molecular Immunology. 4th edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 553 pp.
- Abdulhadi NH (2003) Protection against severe clinical manifestations of *Plasmodium falciparum* malaria among sickle cell trait subjects is due to modification of the release of cytokines and/or cytoadherence of infected erythrocytes to the host vascular beds. *Med Hypotheses* 60(6):912-914.
- Accioly J (1947) Anemia falciforme: apresentação de um caso com infantilismo. *Arq Fac Med Univ Federal Bahia* 2:198.
- Alayash AI, Bonaventura J and al-Quorain A (1989) A benign sickle-cell disease in a Saudi subject with beta zero-thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Hum Hered* 39(2):118-120.
- Atweh GF, Sutton M, Nassif I, Boosalis V, Dover GJ, Wallenstein S, Wright E, McMahon L, Stamatoyannopoulos G, Faller DV and Perrine SP (1999) Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. *Blood* 93:1790-1797.
- Azevêdo E (1973) Historical note on inheritance of sickle cell anemia. *Am J Hum Genet* 25(4):457-458.
- Ballas SK (2001) Effect of α -globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med* 20:107-121.
- Ballas SK and Mohandas N (1996) Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 10(6):1221-1239.
- Ballas SK and Mohandas N (2004) Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation* 11(2):209-225.
- Barrett-Connor E (1971) Bacterial infection and sickle cell anemia. An analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. *Medicine* 50:97-112.
- Bayley JP, Baggen JM, van der Pouw-Kraan T, Crusius JB, Huizinga TW and Verweij CL (2003) Association between polymorphisms in the human chemokine receptor genes CCR2 and CX3CR1 and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 62(2):170-174.
- Beet EA (1949) The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. *Ann Eugen* 14:279-284.
- Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP and Vercellotti GM (2000) Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 96(7):2451-2459.
- Bjornson AB, Lobel JS and Harr KS (1985) Relation between serum opsonic activity for *Streptococcus pneumoniae* and complement function in sickle cell disease. *J Infect Dis*

152(4):701-709.

- Blau CA, Constantoulakis P, Shaw CM and Stamatoyannopoulos (1993) Fetal hemoglobin induction with butyric acid: efficacy and toxicity. *Blood* 81:529-537.
- Boussiou M, Loukopoulos D, Christakis J and Fessas P (1991) The origin of the sickle mutation in Greece; evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. *Hemoglobin* 15(6):459-467.
- Bursill CA, Channon KM and Greaves DR (2004) The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol* 15(2): 145-149.
- Carrell RW, Winterbourn CC and Rachmilewitz EA (1975) Activated oxygen and haemolysis. *Br J Haematol* 30(3):259-264.
- Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR and Dover GJ (1995) An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, β -globin haplotypes, α -globin gene number, gender, and age. *Blood* 85:1111-1117.
- Chang YP, Maier-Redelsperger M, Smith KD, Contu L, Ducroco R, de Montalembert M, Belloy M, Elion J, Dover GJ and Girot R (1997) The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br J Haematol* 96:806-814
- Chebloune Y, Pagnier J, Trabuchet G, Faure C, Verdier G, Labie D and Nigon V (1988) Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(12):4431-4435
- Chen Z, Yu S, Bakhiet M, Winblad B and Zhu J (2003) The chemokine receptor CCR5 is not a necessary inflammatory mediator in kainic acid-induced hippocampal injury: evidence for a compensatory effect by increased CCR2 and CCR3. *J Neurochem* 86(1):61-68.
- Chies JAB and Hutz MH (2003) High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 36(1):71-75.
- Chies JAB and Nardi NB (2001) Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Medical Hypotheses* 57(1):46-50.
- Chiu DTY, van den Berg J, Kuypers FA, Hung IJ, Wei JS and Liu TZ (1996) Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. *Free Radic Biol Med* 21:89-95.
- Claster S and Vichinsky EP (2003) Managing sickle cell disease. *BMJ* 327:1151-1155.
- Davies SC and Oni L (1997) Fortnightly review: Management of patients with sickle cell

- disease. *BMJ* 315:656-660.
- Davies SC, Cronin E, Gill M, Greengross P, Hickman M and Normand C (2000) Screening for sickle cell disease and thalassaemia: a systematic review with supplementary research. *Health Technol Assess* 4(3). <http://www.ncchta.org/fullmono/mon403.pdf> (11 Mar 2004).
- Dawson TC, Beck MA, Kuziel WA, Henderson F and Maeda N (2000) Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am J Pathol* 156(6):1951-1959.
- Deisseroth A, Nienhuis A, Lawrence J, Giles R, Turner P and Ruddle FH (1978) Chromosomal localization of human beta globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(3):1456-1460.
- Dover GJ, Brusilow S and Charache S (1994) Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* 84:339-343.
- Eaton WA (2003) Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophys Chem* 100(1-3):109-116.
- el-Hazmi MA, al-Momen A, Warsy AS, Kandaswamy S, Huraib S, Harakati M and al-Mohareb F (1995) The pharmacological manipulation of fetal haemoglobin: trials using hydroxyurea and recombinant human erythropoietin. *Acta Haematol* 93(2-4):57-61.
- Emmel VE (1917) A study of erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. *Arch Intern Med* 20:586-599.
- Fabry ME, Fine E, Rajanayagam V, Factor SM, Gore J, Sylla M, and Nagel RL (1992) Demonstration of endothelial adhesion of sickle cells *in vivo*: a distinct role for deformable sickle cell discocytes. *Blood* 79:1602-1611.
- Fabry ME, Suzuka SM, Weinberg RS, Lawrence C, Factor SM, Gilman JG, Constantini F and Nagel RL (2001) Second generation knockout sickle mice: the effect of HbF. *Blood* 97:410-418.
- Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, Fishlock K and Brown KA (1998) Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 91:266-274.
- Fatini C, Gensini F, Sticchi E, Battaglini B, Angotti C, Conforti ML, Generini S, Pignone A, Abbate R and Matucci-Cerinic M (2002) High prevalence of polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (I/D) and endothelial nitric oxide synthase (E298D) in patients with systemic sclerosis. *Am J Med* 112(7):540-544.
- Ferster A, Tahiri P, Vermylen C, Sturbois G, Corazza F, Fondu P, Devalck C, Dresse MF, Feremans W, Hunninck K, Toppet M, Van Geet C and Sariban E (2001) Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. *Blood* 97:3628-3632.

- Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Gelpi AP (1973) Migrant populations and the diffusion of the sickle-cell gene. *Ann Intern Med* 79:258-264.
- Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA and Cannon III RO (2003) Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation* 107:271-278.
- Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, Bomfim G, Adorno EV, Albuquerque AL, Pontes A, Dupuit MF, Fernandes GB and dos Reis MG (2003) Beta^S haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 36:1283-1288.
- Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R and Helms PJ (1999) Association of CCR5 delta-32 with reduced risk of asthma. *Lancet* 354:1264-1265.
- Halsey C and Roberts IAG (2003) The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *Br J Haematol* 120:177-186.
- Harlan JM (2000) Introduction: anti-adhesion therapy in sickle cell disease. *Blood* 95:365-367.
- Haynes J, Baliga BS, Obiako B, Ofori-Acquah S and Pace B (2004) Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood* 103:3945-3950.
- Hebbel RP (1991) Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 77:214-237.
- Hebbel RP (1997) Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest* 99(11):2561-2564.
- Hebbel RP, Boogaerts MA, Eaton JW and Steinberg MH (1980) Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of the disease severity. *N Engl J Med* 302(18):992-995.
- Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M and Steinberg MH (1982) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 70:1253-1259.
- Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW and Hedlund BE (1988) Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:237-241.
- Hebbel RP, Osarogiagbon R and Kaul D (2004) The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11:129-151.
- Herfarth H, Pollok-Kopp B, Göke M, Press A and Oppermann M (2001) Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Crohn's disease. *Immunol Lett* 77:113-117.

- Herrick JB (1910) Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 6:517-521.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM and Brown MJ (1999) A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100:1515-1520.
- Hood AT, Fabry ME, Costantini F, Nagel RL and Shear HL (1996) Protection from lethal malaria in transgenic mice expressing sickle hemoglobin. *Blood* 87:1600-1603.
- Hoover R, Rubin R, Wise G and Warren R (1979) Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood* 54(4):872-876.
- Hutz MH and Salzano FM (1983) Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil: demographic, clinical and laboratory data. *Braz J Med Biol Res* 16:219-226.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000) Censo Demográfico 2000. Características gerais da população. Resultado da amostra. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/populacao/censo2000_populacao.pdf (11 Mar 2004).
- Inati A, Taher A, Bou Alawi W W., Koussa S, Kaspar H, Shbaklo H and Zalloua PA (2003) β -Globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. *Eur J Haematol* 70:79-83.
- Ingram VM (1959) Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochim Biophys Acta* 36:402-411.
- Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M and Shlomcik MJ (2001) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th edition. Garland Publishing, New York, 732 pp.
- Kaul DK and Heibel RP (2000) Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 106(3):411-420.
- Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakada MT, Nagel RL and Collier BS (2000) Monoclonal antibodies to α V β 3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood* 95:368-374.
- King SB (2004) Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic Biol Med* 37(6):737-744.
- Koshy M, Dorn L, Bressler L, Molokie R, Lavelle D, Talischy N, Hoffman R, van Overveld W and DeSimone J (2000) 2-deoxy 5-azacytidine and fetal hemoglobin induction in sickle cell anemia. *Blood* 96:2379-2384.
- Kulozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BC, Al-Awamy B, Essan GJ, Falusi AG, Haque SK, Hilali AM, Kate S, Ranasinghe WAEP and Weatherall DJ (1986)

- Geographical survey of beta S-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet* 39(2):239-244.
- Kulozik AE, Kar BC, Satapathy RK, Serjeant BE, Serjeant GR and Weatherall DJ (1987) Fetal hemoglobin levels and beta s globin haplotypes in an Indian population with sickle cell disease. *Blood* 69:1742-1746.
- Lapoumeroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobe M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J and Krishnamoorthy R (1992) A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* 89(3):333-337.
- Lavinha J, Gonçalves J, Faustino P, Romão L, Osório-Almeida L, Peres MJ, Picanço I, Martins MC, Ducrocq R, Labie D and Krishnamoorthy R (1992) Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Hum Biol* 64(6):891-901.
- Lee B, Doranz BJ, Rana S, Yi Y, Mellado M, Frade JM, Martinez-A C, O'Brien SJ, Dean M, Collman RG and Doms RW (1998) Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J Virol* 72(9):7450-7458.
- Lee K, Gane P, Roudot-Thoraval F, Godeau B, Bachir D, Bernaudin F, Cartron JP, Galactéros F and Bierling P (2001) The nonexpression of CD36 on reticulocytes and mature red blood cells does not modify the clinical course of patients with sickle cell anemia. *Blood* 98:966-971.
- Lehmann H, Maranjian G and Mourant AE (1963) Distribution of sickle-cell haemoglobin in Saudi Arabia. *Nature* 198:492-493.
- Lessin LS and Jensen WN (1974) Sickle cell anemia 1910-1973. An overview. *Arch Intern Med* 133:529-532.
- Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK and Ofili E (2004) Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in african americans. *Am J Hypertens* 17:560-567.
- Liakopoulou E, Blau CA, Li Q, Josephson B, Wolf JA, Fournarakis B, Raisys V, Dover G, Papayannopoulou T and Stamatoyannopoulos G (1995) Stimulation of fetal hemoglobin production by short chain fatty acids. *Blood* 86:3227-3235.
- Lin CC, Draper PN and De Braekeleer M (1985) High-resolution chromosomal localization of the beta-gene of the human beta-globin gene complex by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 39(4):269-274.
- McDonald DM, Alp NJ and Channon KM (2004) Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase E298D polymorphic variants in human endothelial cells. *Pharmacogenetics* 14(12):831-839.

- Maier-Redelsperger M, Labie D and Elion J (1999) Long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. *Curr Opin Hematol* 6(2):115-120.
- Makis AC, Hatzimichael EC, Mavridis A and Bourantas KL (2000) Alpha-2-macroglobulin and interleukin-6 levels in steady-state sickle cell disease patients. *Acta Haematol* 104:164-168.
- Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC and Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478-17488.
- Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A and Embury SH (2001) P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* 98:1955-1962.
- Miller ST, Sleeper LA, Pegelow CH, Enos LE, Wang WC, Weiner SJ, Wethers DL, Smith J and Kinney TR (2000) Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. *N Engl J Med* 342(2):83-89.
- Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S and Tashiro K (2003) C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 145:135-138.
- de Montalembert M, Belloy M, Bernaudin F, Gouraud F, Capdeville R, Mardini R, Philippe N, Jais JP, Bardakdjian J, Ducrocq R, Maier-Redelsperger M, Elion J, Labie D and Girot R (1997) Three-year follow-up of hydroxyurea treatment in severely ill children with sickle cell disease. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 19(4):313-318.
- Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP and Styles LA (2000) Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 22(6):515-520.
- Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris Jr. SM and Kuypers FA (2003) Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 25(8):629-634.
- Nagel RL and Fleming AF (1992) Genetic epidemiology of the beta s gene. *Baillieres Clin Haematol* 5(2):331-365.
- Nagel RL and Steinberg MH (2001) Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatr Pathol Mol Med* 20(2):123-136.
- Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V and Labie D (1985) Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med* 312 (14):880-884.
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y and Nakao K (1999) T⁻⁷⁸⁶→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870.

- Naoum PC (2000) Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 22(1):05-22.
- Neel JV (1947) The clinical detection of the genetic carriers of inherited disease. *Medicine* 26:115-153.
- Neel JV (1949) The inheritance of sickle cell anemia. *Science* 110:64.
- Okpala I (2004) The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev* 18:65-73.
- OPAS/OMS Organização Pan-Americana da Saúde. Escritório de Representação no Brasil (1998) A Saúde no Brasil. <http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/SAUDEBR.PDF> (10 Mar 2004).§
- Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL and Labie D (1984) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(6):1771-1773.
- Pante-De-Sousa G, Mousinho-Ribeiro RC, Dos Santos EJ and Guerreiro JF (1999) Beta-globin haplotypes analysis in Afro-Brazilians from the Amazon region: evidence for a significant gene flow from Atlantic West Africa. *Ann Hum Biol* 26(4):365-373.
- Pauling L, Itano HA, Singer SJ and Wells IC (1949) Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 110:543-548.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH and Klug PP (1994) Mortality in sickle cell disease – Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330(23):1639-1644.
- Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E and Kinney TR (1991) Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 325 (1):11-16.
- Quinn CT, Rodgers ZR and Buchanan GR (2004) Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 103:4023-4027.
- Ragusa A, Lombardo M, Sortino G, Lombardo T, Nagel RL and Labie D (1988) Beta S gene in Sicily is in linkage disequilibrium with the Benin haplotype: implications for gene flow. *Am J Hematol* 27(2):139-141.
- Ramana GV, Chandak GR and Singh L (2000) Sickle cell gene haplotypes in Relli and Thurpu Kapu populations of Andhra Pradesh. *Hum Biol* 72:535-40.
- Rapoport RM and Murad F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through CGMP. *Circ Res* 52:352-357.
- Rice-Evans C, Omorphos SC and Baysal E (1986) Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J* 237(1):265-269.

- Saleh AW and Hillen HFP (1997) Pharmacological induction of foetal haemoglobin synthesis in sickle-cell disease. *Neth J Med* 51(5):169-178.
- Salzano FM (1986) Em busca das raízes. *Ciência Hoje* 5:48-53.
- Serjeant GR (2001) The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol* 112:3-18.
- Setty BNY, Kulkarni S and Stuart MJ (2002) Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* 99:1564-1571.
- Sharan K, Surrey S, Ballas S, Borowski M, Devoto M, Wang KF, Sandler E and Keller M (2004) Association of $T^{786}C$ eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol* 124:240-243.
- Shear HL, Roth Jr. EF, Fabry ME, Costantini FD, Pachnis A, Hood A and Nagel RL (1993) Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood* 81:222-226.
- Shear HL, Grinberg L, Gilman J, Fabry ME, Stamatoyannopoulos G, Goldberg DE and Nagel RL (1998) Transgenic mice expressing human fetal globin are protected from malaria by a novel mechanism. *Blood* 92:2520-2526.
- Sherman IJ (1940) The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from sickle cell trait. *Bull Johns Hopkins Hospital* 67:309-324.
- Smith, MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study, O'Brien SJ (1997) Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 277:959-965.
- Steinberg MH and Rodgers GP (2001) Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin Hematol* 38:299-306.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Sauntharajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D and Terrin M (2003) Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia. *JAMA* 289:1645-1651.
- Sullivan KJ, Kissoon N, Duckworth LJ, Sandler E, Freeman B, Bayne E, Sylvester JE and Lima JJ (2001) Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS I gene is associated with acute chest syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164:2186-2190.
- Sutton M, Atweh GF, Cashman TD and Davis WT (1999) Resolving conflicts:

- misconceptions and myths in the care of the patient with sickle cell disease. *Mt Sinai J Med* 66(4):282-285.
- Tanus-Santos JE, Desai M and Flockhart DA (2001) Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 11:719-725.
- Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA and Freedman JE (2002) Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics* 12(5):407-413.
- Teixeira SM, Cortellazzi LC and Grotto HZW (2003) Effect of hydroxyurea on G gamma chain fetal hemoglobin synthesis by sickle-cell disease patients. *Braz J Med Biol Res* 36:1289-1292.
- Thomas PW, Higgs DR and Serjeant GR (1997) Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. *J Clin Epidemiol* 50(2):121-126.
- Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS and Frenette PS (2002) Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci* 99:3047-3051.
- van den Berg JJM, Kuypers FA, Lubin BH, Roelofsen B and Op den Kamp JAF (1991) Direct and continuous measurement of hydroperoxide-induced oxidative stress on the membrane of intact erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 11:255-261.
- Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B and the Cooperative Study of Sickle Cell Disease (1997) Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. *Blood* 89:1787-1792.
- Wainscoat JS, Bell JI, Thein SL, Higgs DR, Serjeant GR, Peto TEA and Weatherall DJ (1983) Multiple origins of the sickle mutation: evidence from β^S -globin gene cluster polymorphisms. *Mol Biol Med* 1:191-197.
- Wainscoat JS (1987) The origin of mutant beta-globin genes in human populations. *Acta Haematol* 78(2-3):154-158.
- Wang XL and Wang J (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70(4): 241-251.
- Weatherall DJ (1997) ABC of clinical haematology: The hereditary anaemias. *BMJ* 314:492.
- Wetterstroem N, Brewer GJ, Warth JA, Mitchinson A and Near K (1984) Relationship of glutathione levels and Heinz body formation to irreversibly sickled cells in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 103(4):589-596.
- Wong WY, Overturf GD and Powars DR (1992) Infection caused by *Streptococcus pneumoniae* in children with sickle cell disease: epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. *Clin Infect Dis* 14(5):1124-1136.

- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Suziyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y and Nakao K (1998) A missense E298D variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 103:65–69.
- Zago MA, Figueiredo MS and Ogo SH (1992) Bantu β^s cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol* 88(3):295-298.
- Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC and Alvarez V (2000) CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 1(4):288-289.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO (MODELO)

Responsáveis: _____

Consentimento Pós-Informação

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo _____

Os dados necessários para a realização do projeto serão obtidos através de entrevistas com as famílias, análise dos prontuários e uma coleta de aproximadamente duas colheres de sopa de sangue da veia. Este procedimento provoca um desconforto semelhante ao de uma coleta de sangue para exames de rotina, ou seja, a dor da picada da agulha e um pequeno hematoma (cor roxa) na pele.

O material coletado será utilizado para _____

_____, sendo garantido o anonimato das informações obtidas, reservando ao paciente ou familiares acesso às mesmas.

Pelo presente Consentimento Pós-informação, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente Projeto de Pesquisa. Os Pesquisadores responsáveis pelo _____ projeto _____ são _____

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta ou esclarecimento sobre a pesquisa a ser realizada, da liberdade de não participar do estudo, da segurança, do anonimato e do carácter confidencial das informações.

Autorizo o armazenamento do material coletado (____) para pesquisas futuras referentes à _____

()SIM

()NÃO

Data: ____/____/____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do responsável legal: _____

Pesquisador responsável: _____

ANEXO 2

PROTOCOLO DE ANEMIA FALCIFORME

IDENTIFICAÇÃO:

1. Nome do paciente: _____
2. Registro: _____ Data inicial: _____
3. Endereço: _____
4. Fone: _____

DADOS DEMOGRÁFICOS:

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

HISTÓRIA FAMILIAR:

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

HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA:

14. Idade da menarca: _____ anos
15. Número de gestações: _____
16. Número de abortos: _____
17. Natimortos: _____
18. Filhos vivos: _____
19. Filhos mortos: _____

HISTÓRIA MÓRBIDA PROGRESSIVA:

20. Total de crises álgicas (abdômen, tórax ou óssea): _____
21. Total de infecções: _____
22. Total de transfusões: _____
23. Total de internações: _____
24. Úlcera em Msls: ()sim ()não
25. Osteomielite: ()sim ()não
26. Pneumonia: ()sim ()não
27. AVC: ()sim ()não

- 28.TVP: ()sim ()não
 29.Dor crônica: ()sim ()não
 30.Colelitíase: ()sim ()não
 31.Evolução da colelitíase: ()assintomática ()infecção ()cirurgia ()litíase biliar
 32.Retinopatia: ()sim ()não
 33.Hipostenúria: ()sim ()não
 34.Seqüestro esplênico: ()sim ()não
 35.Priapismo: ()sim ()não
 36.Necrose asséptica: ()sim ()não
 37.Trombocitose: ()sim ()não
 38.Leucocitose: ()sim ()não

EXAMES COMPLEMENTARES:

Ecografia abdominal

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

Ecocardiografia

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

Eletrocardiograma

45. _____

Exames laboratoriais séricos

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

Exames laboratoriais hematológicos

- 52.Hematócrito: _____
 53.Hemoglobina: _____
 54.VCM: _____
 55.CHCM: _____
 56.RDW: _____
 57.Reticulócitos: _____
 58.Plaquetas: _____
 59.Leucócitos: _____
 60.Eletroforese de hemoglobinas: HbA₂_____ HbA_____ HbS_____ HbC_____ HbF_____

Data de início da Hidroxiuréia (HU): ____/____/____

- 61.HbF no início do tratamento com HU: _____
62.Ht no início do tratamento com HU: _____
63.Hb no início do tratamento com HU: _____
64.Dose inicial: _____mg
65.Última data de uso da HU: ____ / ____ / ____
66.HbF na última data de uso: _____
67.Ht na última data de uso: _____
68.Hb na última data de uso: _____

ANEXO 3

TABELA A: Distribuição dos pacientes por genótipo e *pain rate*

	<i>AA (1/2)</i>	<i>Aa (1/2)</i>	<i>aa (1/2)</i>	<i>N (1/2)</i>	<i>P</i>
$T^{-786}C$ (promotor)	49 (8/41)	18 (6/12)	4 (ausente/4)	71 (14/57)	0.27
E298D (éxon 7)	52 (10/42)	16 (3/13)	3 (1/2)	71 (14/57)	0.74
VNTR (íntron 4)	36 (7/29)	30 (5/25)	5 (2/3)	71 (14/57)	0.47
CCR2	47 (9/38)	23 (5/18)	1 (ausente/1)	71 (14/57)	1
CCR5	67 (14/53)	4 (ausente/4)	ausente	71 (14/57)	0.58

AA, *Aa* and *aa* correspondem aos seguintes genótipos: *TT*, *TC* e *CC* (promotor); *EE*, *ED* e *DD* (éxon 7); *4b/4b*, *4b/4a* e *4a/4a* (íntron 4); *CCR2/CCR2*, *CCR2/64I* e *64I/64I* (*CCR2*); *CCR5/CCR5*, *CCR5/CCR5delta32* e *CCR5delta32/CCR5delta32* (*CCR5*).

1 = pacientes com 1 crise de dor por ano ou menos;

2 = pacientes com 2 ou mais crises de dor por ano.

Não há dados quanto ao número de crises de dor para dois pacientes da amostra, os quais foram excluídos das análises de dados clínicos.

TABELA B: Distribuição dos pacientes por frequência alélica e *pain rate*

	<i>CCR2-64I</i>	<i>CCR5delta32</i>	^{-786}C	<i>298D</i>	<i>4a</i>
1	0.18	ausente	0.21	0.18	0.32
2	0.17	0.03	0.17	0.15	0.27
<i>P</i>	1	0.58	0.59	0.77	0.64

1 = pacientes com 1 crise de dor por ano ou menos;

2 = pacientes com 2 ou mais crises de dor por ano.

TABELA C: Distribuição dos pacientes por genótipo e incidência de complicações cardíacas e/ou vasculares

	<i>AA (C/N)</i>	<i>Aa (C/N)</i>	<i>aa (C/N)</i>	<i>N (C/N)</i>	<i>P</i>
T ⁻⁷⁸⁶ C (promotor)	50 (17/33)	17 (5/12)	4 (1/3)	71 (23/48)	1
E298D (éxon 7)	53 (20/33)	15 (3/12)	3 (ausente/3)	71 (23/48)	0.23
VNTR (íntron 4)	35 (11/25)	31 (10/20)	5 (2/3)	71 (23/48)	0.93
CCR2	48 (16/31)	22 (6/17)	1 (1/ausente)	71 (23/48)	0.26
CCR5	67 (22/45)	4 (1/3)	ausente	71 (23/48)	1

AA, Aa and *aa* correspondem aos seguintes genótipos: *TT, TC* e *CC* (promotor); *EE, ED* e *DD* (éxon 7); *4b/4b, 4b/4a* e *4a/4a* (íntron 4); *CCR2/CCR2, CCR2/64I* e *64I/64I* (CCR2); *CCR5/CCR5, CCR5/CCR5delta32* e *CCR5delta32/CCR5delta32* (CCR5).

C = grupo de pacientes com complicações cardíacas e/ou vasculares;

N = grupo controle (pacientes sem complicações cardíacas e/ou vasculares).

TABELA D: Distribuição dos pacientes por frequência alélica e incidência de complicações cardíacas e/ou vasculares

	<i>CCR2-64I</i>	<i>CCR5delta32</i>	⁻⁷⁸⁶ <i>C</i>	<i>298D</i>	<i>4a</i>
C	0.17	0.02	0.15	0.06	0.30
N	0.18	0.03	0.19	0.19	0.27
<i>P</i>	1	1	0.81	0.07	0.69

C = grupo de pacientes com complicações cardíacas e/ou vasculares;

N = grupo controle (pacientes sem complicações cardíacas e/ou vasculares).

ANEXO 4

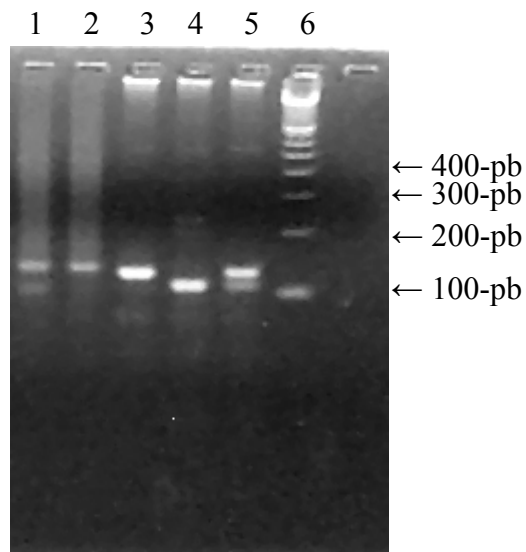


Figura 1: Genotipagem de CCR2 e CCR5. 1: *CCR5/CCR5delta32*; 2: *CCR5/CCR5*; 3: *CCR2/CCR2*; 4: *64I/64I*; 5: *CCR2/64I*; 6: DNA padrão de 100-pb.

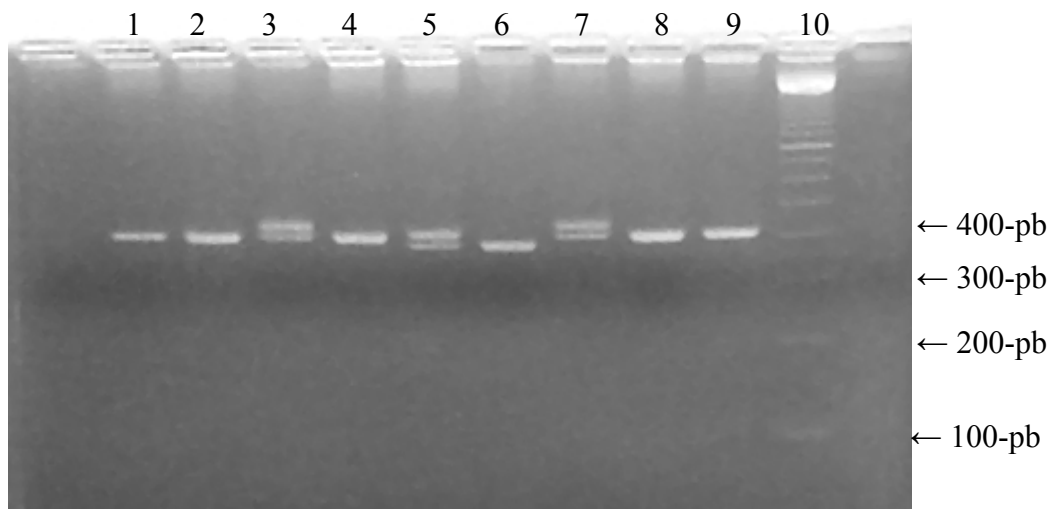


Figura 2: Genotipagem do VNTR (intron 4) no gene *NOS3*. 1, 2, 4, 8 e 9: *4b/4b* (homozigotos para o alelo de 420-pb); 3 e 7: *4b/4y* (heterozigotos para os alelos de 420-pb e 447-pb); 6: *4a/4a* (homozigoto para o alelo de 393-pb); 10: DNA padrão de 100-pb.