

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

EXPRESSÃO GÊNICA E PERFIL IMUNOGENÉTICO DE PACIENTES
COM ANEMIA FALCIFORME

Andréia Escosteguy Vargas

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor.

Orientador: Prof. José Artur Bogo Chies, PhD

Co-orientador: Prof. Andrés Delgado-Cañedo, PhD

Porto Alegre

Abril, 2009

Instituições e Fontes Financiadoras:

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular do Instituto de Cardiologia-Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC), 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.

*Este trabalho é dedicado às pessoas que o
tornaram possível, e àquelas que não
acreditaram que ele assim o fosse.*

*Agradeço àquelas pela confiança e pelo apoio, e a
estas, por me desafiarem a provar o contrário.*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	05
Resumo.....	07
Abstract.....	08
Capítulo 1 – Introdução.....	09
1.1. Anemia Falciforme - Bases Moleculares.....	10
1.2. Anemia Falciforme - Dados Históricos e Populacionais.....	12
1.3. Anemia Falciforme - Características Clínicas.....	15
1.4 Anemia Falciforme, Hemoglobina Fetal e Hidroxiuréia.....	20
1.5 Anemia Falciforme e Biomarcadores de Inflamação.....	25
1.5.1 Moléculas de Adesão.....	25
1.5.2 Citocinas.....	28
Objetivos.....	33
Capítulo 2 – Analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma of steady-state sickle cell disease patients.....	34
Capítulo 3 - ICAM-1 and PECAM-1 polymorphisms in sickle cell disease patients.....	47
Capítulo 4 – Differential gene expression in erythroid cells from sickle cell disease patients.....	64
Capítulo 5 – Discussão.....	96
Referências Bibliográficas.....	105
Anexo 1 - Termo de Consentimento Pós-Informação (modelo).....	116

LISTA DE ABREVIATURAS

5'UTR: região 5' não-traduzida;

AA: genótipo homocigoto para hemoglobina adulta normal;

ADCY6: gene que codifica uma isoforma da adenilil ciclase;

ADRB2: gene do receptor adrenérgico beta 2;

AVC: acidente vascular cerebral;

BEN: haplótipo associado ao alelo HBB*S tipo Benin;

CAR: haplótipo associado ao alelo HBB*S tipo Bantu;

CCR: receptor de quimiocina com motivo C-C;

CVO: crise vaso-oclusiva;

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

ET-1: endotelina-1;

FCP: *F-cell production*; locus ligado ao X, que regula produção de células F;

GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônias – granulócito-macrófago);

HbA: hemoglobina adulta;

HBB*S: alelo mutante que produz a hemoglobina S;

HbF: hemoglobina fetal;

HbS: hemoglobina S;

HU: hidroxuréia;

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

ICAMs: *intercellular adhesion molecules* (moléculas de adesão intercelulares);

IL: interleucina;

iNOS: *inducible nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintetase indutível);

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico);

NOS: *nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintetase);

PECAM: *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (molécula de adesão de plaqueta e célula endotelial);

PGE2: prostaglandina E2;

PI: *proliferation index* (índice de proliferação);

PS: *phosphatidylserine* (fosfatidilserina);

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

SEN: haplótipo associado ao alelo HBB*S tipo Senegal;

SS: genótipo homozigoto para o alelo HBB*S;

SSRE: *shear stress responsive element* (elemento de resposta a estresse);

TNF: *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral);

TSP: trombospondina;

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

VO: vaso-oclusão;

vWF: fator de von Willebrand;

ZL: zileuton.

RESUMO

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia de grande heterogeneidade clínica, que vem sendo abordada como uma condição inflamatória crônica nas últimas décadas. A maioria dos pacientes com anemia falciforme faz uso da hidroxiuréia (HU), uma droga citotóxica que induz a produção de hemoglobina fetal (HbF). Apesar de amplamente utilizada, os detalhes do mecanismo de ação da HU não estão completamente estabelecidos. Este trabalho propôs-se a estudar a expressão gênica de células eritróides de pacientes com anemia falciforme diferenciadas *in vitro* e tratadas com HU, através da técnica de DD-PCR, bem como dar continuidade aos estudos imunogenéticos em andamento neste laboratório, através da análise de citocinas séricas pró- e anti-inflamatórias e do estudo de polimorfismos nos genes que codificam as moléculas de adesão ICAM-1 e PECAM-1, nestes pacientes. As análises de DD-PCR revelaram genes envolvidos em tradução, transcrição e outros processos, dos quais 3 foram escolhidos para discussão detalhada, com base em sua função (*NACA*, *LXN* e *THRA*). Os polimorfismos estudados (ICAM-1 rs5498, PECAM-1 53 G/A e PECAM-1 rs668) não apresentaram relação com o quadro clínico da doença, e as freqüências alélicas e genotípicas foram semelhantes em pacientes e controles. Os níveis das citocinas pró- e anti-inflamatórias (interleucinas 2, 4, 5 e 10, interferon-gama e TNF-alfa), investigadas através de citometria de fluxo, não foram diferentes na comparação entre controles e pacientes.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a hemoglobinopathy 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. Most of the SCD patients are under treatment with hydroxyurea (HU), a cytotoxic drug which induces the production of fetal hemoglobin. Despite its widespread use, the mechanisms by which HU acts to improve the clinical picture of SCD patients are not fully understood. The present study aimed to investigate the gene expression of erythroid cells from SCD patients differentiated in vitro and cultivated with HU, as well as to continue the ongoing immunogenetic studies on SCD patients in our lab, by analyzing plasma cytokines and investigating polymorphisms on the adhesion molecules iICAM-1 and PECAM-1 in a group of SCD patients. Our DD-PCR analysis revealed several genes involved in transcription and translation, among other processes, and we chose 3 of those genes to discuss in more detail (NACA, LXN and THRA). The polymorphisms studied here (ICAM-1 rs5498, PECAM-1 53 G/A and PECAM-1 rs668) were not correlated with the clinical aspects of SCD, and the genotypic and allelic frequencies were similar among patients and controls. The levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (interleukins 2, 4, 5 and 10, interferon-gamma and TNF-alpha) were similar in patients and controls.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme – Bases Moleculares

As hemoglobinopatias são doenças hematológicas caracterizadas pela expressão de moléculas de hemoglobina variantes. Dentre estas doenças, destaca-se a anemia falciforme, a qual resulta de uma mutação pontual no gene que codifica a proteína beta-globina, levando à produção de uma molécula de hemoglobina anormal (HbS). 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).

Em condições de baixa tensão de oxigênio, a HbS 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).

A diferença na seqüência 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, decorrente de uma mutação pontual que envolve a segunda base do códon que codifica o aminoácido 6 da cadeia da beta-globina (GAG→GIG), 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 observaram Pauling *et al.* (1949).

A molécula da hemoglobina adulta apresenta estrutura tetramérica (Figura 1), formada por duas cadeias de α -globina e duas cadeias de beta-globina. Os genes que codificam as cadeias de beta-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 ($\psi\beta 1$) (Figura 2). A beta-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 que codifica a beta-globina tipo β foi mapeado na região 11p15.5 (Lin *et al.*, 1985).

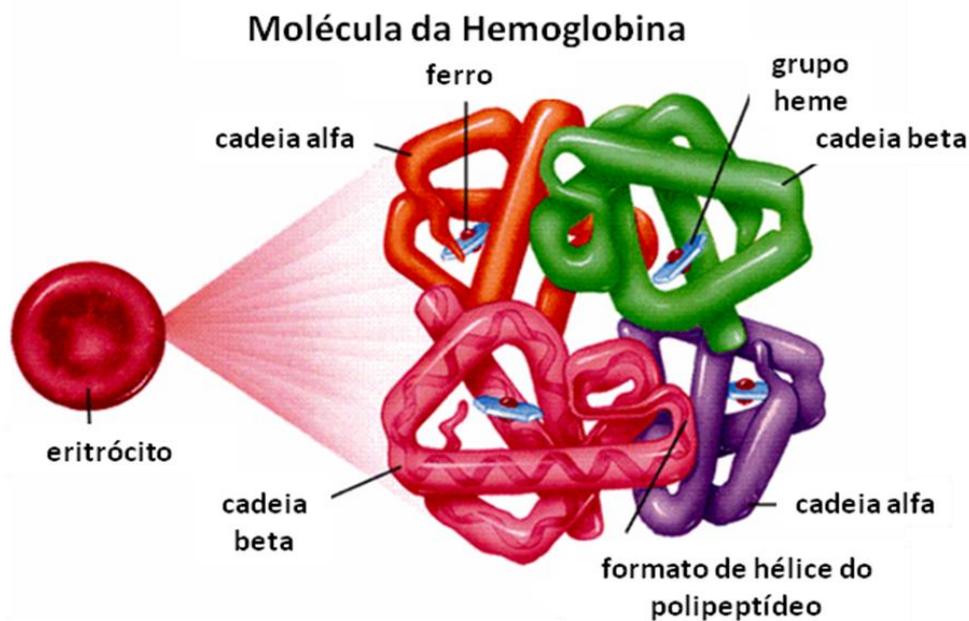


Figura 1: Representação esquemática da molécula da hemoglobina (modificado de Mader, 1997).

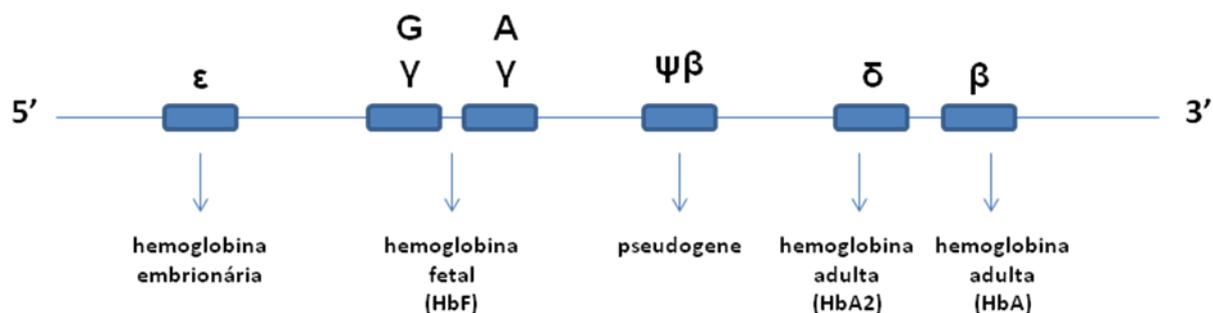


Figura 2: *Cluster* dos genes de beta-globina humanos e respectivas moléculas de hemoglobina a que dão origem.

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 . 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, 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. Este alelo ocorre 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 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano 2000, a população brasileira era composta por cerca de 6,2% de pretos e 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*5* no Brasil (OPAS/OMS, 1998). A freqüência 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 freqüentes entre Afro-descendentes brasileiros diferem daqueles encontrados em Afro-americanos e Afro-jamaicanos, conseqüência dos distintos padrões de tráfico de escravos para as diferentes regiões do continente americano. Nos Estados Unidos e na Jamaica, observa-se o predomínio do haplótipo BEN (para revisão vide Gonçalves *et al.*, 2003). 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% CAR, 30% SEN e 10% BEN. Gonçalves *et al.* (2003) realizaram estudo em pacientes de Salvador (BA) e observaram predominância da combinação CAR/BEN (46,25% dos casos) nestes indivíduos.

1.3 Anemia Falciforme - Características Clínicas

Os pacientes com anemia falciforme apresentam alta susceptibilidade a infecções, especialmente por pneumococos e, principalmente, durante a infância (Barrett-Connor, 1971). Além disso, a falcemização dos eritrócitos ocasiona anemia severa e o bloqueio de vasos e capilares (ou vaso-oclusão, VO). A VO manifesta-se clinicamente como crises de dor, ou crises vaso-oclusivas (CVOs), e pode levar ao comprometimento de órgãos (Ballas & Mohandas, 1996).

A visão clássica da anemia falciforme buscava explicar as manifestações clínicas da doença evocando a mutação genética responsável pela produção da hemoglobina S, a qual provoca a falcemização dos eritrócitos que, por sua vez, ocasionam VO e suas conseqüências clínicas. É lógico que os eritrócitos falcêmicos contribuem significativamente nas manifestações clínicas da anemia falciforme, levando-se em conta especialmente suas características de maior rigidez, maior capacidade de adesão ao endotélio e menor vida útil (quando comparados a eritrócitos normais). Porém, apenas a produção da HbS pode ser atribuída à presença do alelo *HBB*S* nestes pacientes, havendo inúmeras outras características na anemia falciforme que não podem ser explicadas diretamente por este defeito genético (Embury, 2004).

A presença do alelo *HBB*S* e suas conseqüências diretas não são suficientes, por exemplo, para explicar a ampla heterogeneidade do quadro clínico observada nos pacientes com anemia falciforme. Além de fatores ambientais (tais como o acesso à assistência

médica adequada), um número crescente de fatores genéticos vêm sendo relacionados a diferentes aspectos clínicos desta doença. O haplótipo associado ao alelo mutante (Nagel *et al.*, 1985; Kulozik *et al.*, 1987; Ramana *et al.*, 2000), a concomitância de alfa-talassemia (Ballas, 2001), os níveis de hemoglobina fetal (HbF) (Hutz & Salzano, 1983; Platt *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997) e os genes *CCR2* e *NOS3* (Vargas *et al.*, 2005) são alguns exemplos de fatores genéticos que parecem estar envolvidos na modulação do quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme.

A CVO é, sem dúvida, a principal característica clínica apresentada por pacientes com anemia falciforme. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da VO, no entanto, não estão totalmente elucidados. Estudos acerca deste tema têm sugerido que a VO seria o resultado da interação entre eritrócitos falcêmicos, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e substâncias presentes no plasma dos indivíduos afetados. Tais observações levaram à formulação da hipótese de que a anemia falciforme se comporta como uma condição inflamatória crônica, idéia que tem sido corroborada por inúmeros estudos (para revisão vide Chies & Nardi, 2001 e Hebbel *et al.*, 2004).

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 subsequentes 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).

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 dois como indicativa 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 podem, também, estar envolvidos na patofisiologia da vaso-oclusão (para revisão vide Serjeant, 2001).

Em trabalho realizado em nosso laboratório, Dresch (2002) observou que linfócitos T isolados de indivíduos com anemia falciforme (homozigotos SS) têm um índice de

proliferação (PI) maior que as mesmas células de indivíduos controle AA (genótipo homocigoto para hemoglobina adulta normal), enquanto linfócitos T provenientes de indivíduos SC (duplo-heterocigotos para as mutações S e C) 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 observados nesta população de pacientes foram interpretados como resultado do desenvolvimento de um processo inflamatório crônico nestes indivíduos.

Dando continuidade a este estudo, realizou-se em nosso laboratório a análise de variantes polimórficas descritas para o gene *nos3*, que codifica a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), e para os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5, buscando associar a presença de variantes em genes envolvidos em processos inflamatórios com a severidade clínica apresentada por pacientes com anemia falciforme (Vargas *et al.*, 2005).

A distribuição dos polimorfismos do gene da enzima eNOS indicou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles, bem como entre pacientes com quadro clínico severo e aqueles com quadro moderado (Vargas *et al.*, 2005). É interessante notar, porém, que todos os pacientes homocigotos para a variante presente no promotor do gene que codifica a proteína eNOS observados nesta amostra apresentaram quadro clínico severo, quando observado o parâmetro de *pain rate* (taxa de dor, que corresponde ao número de crises de dor por ano). 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 variante em homozigose, estaria contribuindo para o desenvolvimento de um quadro clínico severo nestes pacientes.

Neste trabalho também não foram observadas diferenças estatisticamente 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 ambas as variantes dos receptores de quimiocinas estudados (Vargas *et al.*, 2005). Houve diferença estatisticamente significativa entre as freqüências do alelo *CCR2-64I* observadas em pacientes do sexo masculino e feminino ($p=0,03$). 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 – acidente vascular cerebral, infecção renal e várias internações hospitalares) antes do início do tratamento com HU. Identificaram-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.

A pergunta que surge com esta nova visão a respeito da anemia falciforme é um dilema do gênero “o-ovo-ou-a-galinha”: o que ocorre primeiro, a inflamação ou a vaso-

oclusão? Ou, colocando de outra maneira: a vaso-oclusão resulta de um processo inflamatório, ou é a vaso-oclusão o fator que desencadeia uma cascata de inflamação? As evidências atuais apontam para um ciclo vicioso, em que o processo inflamatório causaria vaso-oclusão, que por sua vez geraria um processo inflamatório, e assim por diante (Hebbel *et al.*, 2004).

1.4 Anemia Falciforme, Hemoglobina Fetal e Hidroxiuréia

Conforme observado inicialmente por Watson (1948), o grau de falcemização das células sangüíneas é menor em crianças pequenas, sugerindo que a hemoglobina adulta estaria envolvida neste processo (revisado por Serjeant, 2001). De fato, experimentos posteriores demonstraram que a HbF não precipita como ocorre com a HbS e, portanto, sua presença poderia contribuir para o menor grau de falcemização observado quando comparados crianças e adultos com anemia falciforme (revisado por Atweh *et al.*, 1999 e Naoum, 2000).

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). Outro fator genético que parece influenciar os níveis de HbF é o haplótipo associado ao alelo *HBB*S* (Steinberg *et al.*, 1997).

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).

Em modelos animais desenvolvidos para o estudo da anemia falciforme, maiores níveis de HbF demonstraram correlação positiva com a melhora do quadro anêmico característico da 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; revisado por Atweh *et al.*, 1999).

Estas observações influenciaram no 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; Steinberg *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; revisado por Halsey & Roberts, 2003), fatores de crescimento hematopoiético, como a eritropoietina (el-Hazmi *et al.*, 1995; revisado por 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. Embora esta droga seja utilizada devido à sua habilidade em aumentar os níveis séricos de HbF, há casos em que os pacientes sob tratamento com HU apresentam melhora clínica sem aumento significativo em seus níveis de HbF, sugerindo outros mecanismos de ação para a HU na modulação do quadro clínico destes pacientes. Estudos indicam que os efeitos benéficos da HU incluem a modificação das interações entre eritrócitos e endotélio vascular (reduzindo a expressão de

moléculas de adesão nos eritrócitos) e a redução do número de leucócitos (o que contribuiria para a diminuição da condição pró-inflamatória) (revisado por Halsey & Roberts, 2003).

A HbF é formada por cadeias de gama-globina A ou G, dependendo do aminoácido (alanina ou glicina) presente na posição 136 da proteína. A proporção de cadeias gama-A (30%) e gama-G (70%) permanece constante durante o desenvolvimento fetal, porém, em eritrócitos adultos, esta proporção se altera e a HbF produzida é composta primordialmente por cadeias gama-A (60%) (revisado por Saleh & Hillen, 1997). A contribuição de ambos os tipos de cadeia gama para as propriedades anti-falcemizantes da HbF parece ser diferente: a cadeia gama-A é menos eficiente na prevenção da polimerização da HbS do que a cadeia gama-G, pois a alanina presente naquela proteína reduz a flexibilidade da molécula, interferindo na sua interação com a cadeia beta-S. Considerando este fato, Teixeira *et al.* (2003) investigaram o efeito da HU sobre a composição de cadeias gama da HbF, em pacientes com anemia falciforme sob tratamento com esta droga. Os resultados mostraram que a taxa de gama-G:gama-A foi significativamente maior no grupo de pacientes tratados com HU, confirmando resultados prévios (Xu & Zimmer, 1998) e sugerindo que a síntese predominante da cadeia gama-G pode ser um dos responsáveis pelo efeito benéfico da HU nestes pacientes.

Levando em conta o potencial citotóxico da HU, os estudos clínicos envolvendo o tratamento de pacientes com anemia falciforme com esta droga têm se preocupado em acessar a toxicidade e a segurança do uso prolongado da HU, tanto em adultos quanto em crianças tratadas. Em seu trabalho de revisão, Halsey & Roberts (2003) encontraram quatro casos de tumores desenvolvidos durante o tratamento com HU descritos na literatura, dos quais apenas dois parecem ter relação com o tratamento. Em estudo que reportou o efeito

da HU sobre a morbidade e a mortalidade em pacientes adultos com anemia falciforme, ao longo de nove anos de tratamento, Steinberg *et al.* (2003) observaram três casos de câncer, dos quais um foi fatal, em um total de 299 pacientes analisados.

Apesar de amplamente utilizada no tratamento de pacientes com anemia falciforme, os detalhes do mecanismo de ação da HU não estão completamente estabelecidos. Trabalhos iniciais reportaram que a HU inibe a síntese de DNA, agindo através da inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (revisado por Cokic *et al.*, 2003). Ho *et al.* (2003) sugerem que este mecanismo de ação é crítico para a indução de HbF por HU *in vivo*, em pacientes com anemia falciforme. Cokic *et al.* (2003) propõem que a indução de HbF por HU é mediada por sua propriedade de doadora de óxido nítrico (NO). Esta característica da HU foi estudada por Gladwin *et al.* (2002), através da análise de pacientes com anemia falciforme sob tratamento com HU. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a terapia com HU está associada com a geração intravascular e intraeritrocítica de NO, sugerindo que o papel do NO na indução de HbF deveria ser explorado.

Outras evidências, no entanto, indicam que a HU agiria regulando de maneira positiva o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) que, por sua vez, agiria sobre a enzima óxido nítrico sintetase (NOS) provocando o aumento da síntese de NO. Morris *et al.* (2003) consideram que ambos os mecanismos podem estar envolvidos na produção de NO mediada pela HU e, desta forma, a modulação dos níveis de HbF seria afetada por ambas as vias de geração de NO. Estes autores reportaram que a co-administração de HU e arginina (substrato a partir do qual a NOS sintetiza NO) para pacientes com anemia falciforme resulta no aumento dos níveis séricos de metabólitos de NO (NO_x), enquanto a arginina somente não é capaz de produzir tal efeito.

Delgado-Cañedo *et al.* (2005), por sua vez, sugerem que a HU interfere na via de

sinalização do ferro, propondo que a síntese de HbF em células eritróides é altamente dependente desta via de sinalização.

A HU reage com a hemoglobina formando ferro nitrosil hemoglobina, nitrito e nitrato. Estas reações, entretanto, não ocorrem na velocidade adequada para justificar o aumento destes compostos observado em pacientes sob tratamento com HU, sugerindo a existência de outros mecanismos de atuação para a HU. Em um trabalho de revisão sobre as propriedades da HU como doadora de NO, King (2004) conclui que, apesar da oxidação química da HU produzir NO ou espécies relacionadas, o local e o mecanismo da conversão *in vivo* da HU não são conhecidos, sugerindo que estudos posteriores são necessários para elucidar tais pontos.

A influência da HU na expressão gênica de pacientes com anemia falciforme começou a ser estudada recentemente. Costa *et al.* (2007) investigaram o perfil de expressão gênica de células da medula óssea de um paciente com anemia falciforme, antes e depois de tratado com HU. Na comparação dos resultados, foram identificados 147 genes diferencialmente expressos, os quais estavam envolvidos na regulação dos processos de transcrição e tradução, tais como *EGR-1*, *CENTB1*, *ARHGAP4* e *RIN3*. O efeito da HU em reticulócitos de pacientes também foi investigado, e dentre os genes com expressão alterada encontrados neste trabalho incluem-se *SUDS3*, *FZD5* e *PHC3*, possivelmente associados com a regulação da expressão de globinas (Moreira *et al.*, 2008). Outro trabalho recente investigou a expressão de mediadores de inflamação em leucócitos de pacientes, tratados ou não com HU, e comparou estes dados àqueles obtidos em indivíduos saudáveis (Lanaro *et al.*, 2009). Os autores reportaram alterações significativas na expressão de genes como *iNOS* (expressão reduzida) e *IL-10* (expressão aumentada) em neutrófilos de pacientes sob tratamento com HU, em comparação aos outros grupos estudados.

1.5 Anemia Falciforme e Biomarcadores de Inflamação

1.5.1 Moléculas de Adesão

As moléculas de adesão estão presentes em diversos tipos celulares e desempenham papel importante no processo inflamatório, mediando tanto a ligação de leucócitos ao endotélio como o rolamento e a migração transendotelial destas células em locais de inflamação (Figura 3). Eritrócitos maduros e imaturos, além de reticulócitos, possuem receptores para moléculas de adesão, através dos quais interagem com leucócitos, plaquetas e células endoteliais. Alguns destes receptores estão ativados nos eritrócitos falcêmicos (revisado por Johnson & Telen, 2008).

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; glicolipídeos 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, especialmente no que concerne sua participação nos episódios de VO (para revisão vide Harlan, 2000, Hebbel *et al.*, 2004 e Okpala, 2004).

Conforme descrito anteriormente, eritrócitos falcêmicos apresentam maior aderência ao endotélio do que eritrócitos normais e recentemente demonstrou-se que esta aderência é modulada por polimorfismos no gene do receptor adrenérgico beta 2 (*ADRB2*) e no gene que codifica uma isoforma da adenilil ciclase (*ADCY6*) (revisado por Zennadi *et al.*, 2008). Considerando estes dados, pode-se especular que polimorfismos que alteram a

expressão e/ou o funcionamento de moléculas de adesão poderiam contribuir para a modulação do quadro clínico de pacientes com anemia falciforme.

Existem diversos grupos ou famílias de moléculas de adesão, e este trabalho concentrou-se no estudo de duas delas: ICAM-1 (ou CD54) e PECAM-1 (ou CD31). Até onde alcança nosso conhecimento no presente momento, não há trabalhos publicados investigando a correlação entre polimorfismos nestas moléculas de adesão e o quadro clínico em anemia falciforme.

As moléculas de adesão intercelulares (*intercellular adhesion molecules*, ICAMs) constituem uma sub-família com 5 membros, dentro do grupo das imunoglobulinas. A molécula ICAM-1, cujo gene é alvo deste estudo, desempenha papel importante na adesão de leucócitos ao endotélio ativado, estabelecendo fortes pontes de ligação com integrinas - outra classe de moléculas de adesão - em locais de inflamação (revisado por Blankenberg *et al.*, 2003). O gene que codifica ICAM-1 está localizado na região 19p13, e polimorfismos existentes neste local têm sido associados a diversas condições inflamatórias, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença de Crohn e distúrbios (Jiang *et al.*, 2002; Matsuzawa *et al.*, 2003; Nejentsev *et al.*, 2003; Pola *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2004). O polimorfismo rs5498 (-1548 A/G ou K469E), estudado aqui, situa-se antes de um sítio doador de *splice* que produz uma isoforma menor da proteína (ICAM-1-S) por *splicing* alternativo. Um estudo recente sugeriu que este polimorfismo pode modificar o processo inflamatório alterando a interação entre as células e regulando, desta maneira, a apoptose (Iwao *et al.*, 2004).

A molécula de adesão de plaqueta e célula endotelial 1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) também é membro da superfamília das imunoglobulinas, e está presente na superfície de monócitos, alguns tipos de linfócitos T, plaquetas e células

endoteliais. Além de exercer função nos processos de migração transendotelial de leucócitos e progenitores hematopoiéticos, na ligação ao parasita da malária e na angiogênese, PECAM-1 também parece ser um importante modulador da função das integrinas (revisado por Newman & Newman, 2003).

Variantes genéticas no gene de PECAM-1, o qual está localizado na região 17q23, têm sido associadas com o desenvolvimento de doenças cardíacas em diferentes grupos étnicos (Wenzel *et al.*, 1999; Sasaoka *et al.*, 2001; Elrayess *et al.*, 2003; Elrayess *et al.*, 2004; Listì *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007), e com a susceptibilidade à malária (Kikuchi *et al.*, 2001; Casals-Pascual *et al.*, 2001). No presente trabalho foram investigados dois polimorfismos descritos em PECAM-1: i) a substituição C/G (rs668, 373 C/G ou L125V), que ocasiona uma troca de aminoácido e provoca a alteração de imunorreatividade da proteína madura (Behar *et al.*, 1996) e ocorre no éxon 3, o qual codifica o primeiro domínio de imunoglobulina da molécula; e ii) a substituição G/A, descrita por Elrayess *et al.* (2003), que ocorre na região 5' não-traduzida (5'UTR) do gene, alterando um elemento de resposta a estresse (*shear stress responsive element, SSRE*).

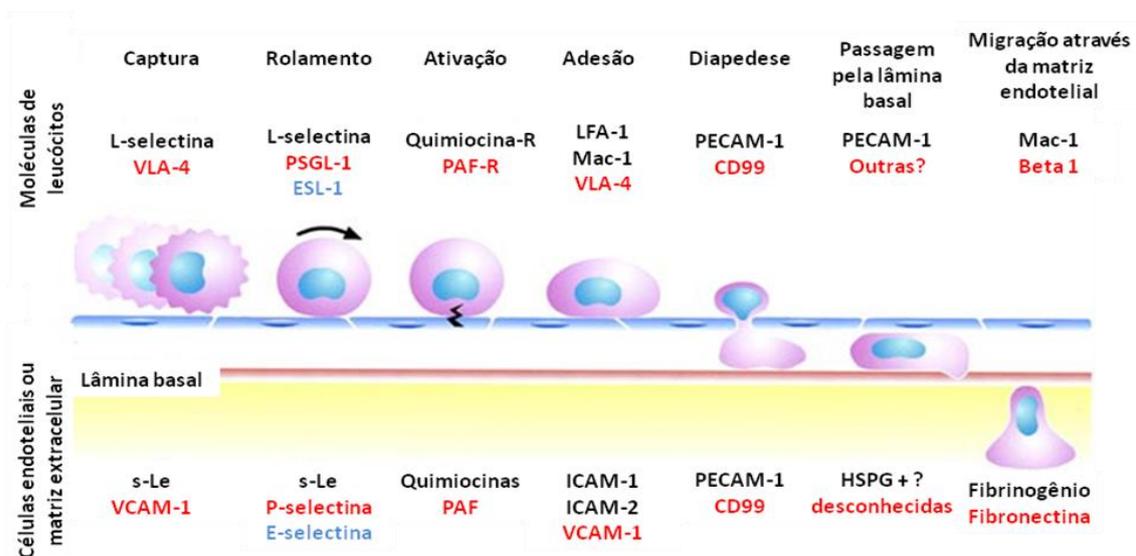


Figura 3: Ilustração representativa do processo de transmigração endotelial de leucócitos

em sítios de inflamação, mediado por moléculas de adesão e outros fatores (modificado de Muller, 2002).

1.5.2 Citocinas

Citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a microorganismos e outros estímulos, que regulam as reações imunológicas e inflamatórias. Caracterizam-se por apresentar, freqüentemente, ação pleiotrópica e redundante: a mesma citocina pode agir em diferentes tipos celulares e diferentes citocinas podem exercer a mesma função efetora. Além disso, podem influenciar a atividade de outras citocinas, provocando efeito de cascata.

A síntese de citocinas geralmente ocorre por nova transcrição gênica, como resultado da ativação celular, ou seja, as moléculas não ficam estocadas na célula. Na maioria dos casos, as citocinas podem ser consideradas “hormônios de ação local”, atuando em locais próximos àqueles em que são produzidas: na própria célula secretora (ação autócrina) ou em células vizinhas (ação parácrina). As citocinas iniciam suas ações com a ligação a receptores de membrana específicos, em células-alvo. A expressão desses receptores é regulada por sinais externos: o estímulo de células T por antígenos leva ao aumento da expressão de receptores de membrana para citocinas (Abbas, 2000).

As citocinas estão aparentemente envolvidas em diversos mecanismos que desencadeiam a vaso-oclusão, tais como a ativação do endotélio, a indução da adesão de eritrócitos e neutrófilos ao endotélio, a ativação de plaquetas e a produção de endotelina-1 (ET-1). Além disso, estão envolvidas na regulação da hematopoiese e na inibição de funções imunológicas (revisado por Makis *et al.*, 2000). Conforme sua atividade, as citocinas podem ser classificadas em pró- ou anti-inflamatórias.

A presença de citocinas, quimiocinas e outros marcadores de inflamação solúveis

vem sendo investigada no soro ou plasma de pacientes com anemia falciforme na última década, especialmente na população norte-americana (Tabela 1). Dentre os fatores mais estudados nestes pacientes, encontram-se o fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF) e as interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8).

A maioria dos trabalhos que incluem o TNF em suas análises reporta níveis aumentados desta citocina no soro ou plasma dos pacientes investigados, que incluem norte-americanos, venezuelanos e brasileiros (Francis & Haywood, 1992; Malavé *et al.*, 1993; Tavakkoli *et al.*, 2004; Lanaro *et al.*, 2009). Em oposição a estes dados, o estudo de pacientes gregos e árabes revelou a ausência de níveis detectáveis de TNF nestes indivíduos (Bourantas *et al.*, 1998 e Raghupathy *et al.*, 2000, respectivamente). É interessante ressaltar que Malavé *et al.* (1993) observaram uma correlação inversa entre a porcentagem de hemoglobina fetal (HbF) e os níveis de TNF encontrados no soro de pacientes venezuelanos. Considerando que a maioria dos pacientes árabes é portadora do haplótipo Árabe-Indiano, notadamente associado a altos níveis de HbF, pode-se especular que esta característica tenha influenciado os resultados observados por Raghupathy *et al.* (2000).

Croizat (1994) também descreve uma correlação entre níveis de HbF e citocinas em pacientes com anemia falciforme: indivíduos com baixos níveis de HbF (< 9%) apresentaram altos níveis plasmáticos de fator estimulador de colônias – granulócito-macrófago (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), enquanto aqueles com alto níveis de HbF não apresentaram níveis detectáveis de GM-CSF. Ainda neste estudo, a autora observou uma correlação direta entre os níveis plasmáticos de HbF e IL-3.

Graido-Gonzalez *et al.* (1998) examinaram os níveis circulantes de ET-1, prostaglandina E2 (PGE2), citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8) e anti-

inflamatórias, (IL-10), durante e após CVOs em pacientes com anemia falciforme. Pacientes em crise apresentaram níveis de ET-1 e de PGE2 maiores do que indivíduos controle sadios. Os outros fatores também avaliados não se mostraram aumentados durante as CVOs ou em pacientes com anemia falciforme assintomáticos. Os autores sugerem que a ET-1, sendo uma potente mediadora de vaso-constricção e inflamação, poderia ter papel importante no ciclo de isquemia e inflamação que provoca a dor durante as CVOs. Além disso, a PGE2 poderia contribuir para a maior susceptibilidade a infecções observada nestes pacientes, uma vez que tem efeito supressor sobre o sistema imunológico.

A IL-8, descrita como um dos mediadores na ligação de leucócitos polimorfonucleares ao endotélio, foi estabelecida como marcador vaso-oclusivo para um grupo de pacientes brasileiros com anemia falciforme (Gonçalves *et al.*, 2001). Os dados deste estudo mostraram um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-8 de pacientes em CVO, comparados aos níveis desta proteína em pacientes estáveis e indivíduos-controle sadios. Estes dados discordam daqueles apresentados por Graido-Gonzalez *et al.* (1998), mas estão de acordo com o observado por Duits *et al.* (1998). Analisando níveis séricos de IL-8 em pacientes com anemia falciforme durante crises de dor, Duits *et al.* (1998) observaram níveis significativamente elevados de IL-8 nestes indivíduos, quando comparados a pacientes assintomáticos e indivíduos sadios. O conjunto destes dados sugere que a citocina IL-8 poderia ter um papel importante durante a CVO.

É interessante ressaltar a importância de estudos realizados com populações brasileiras, levando-se em conta que estas diferem geneticamente de populações norte-americanas e africanas se considerarmos a migração diferencial de africanos para as Américas do Norte e do Sul (para revisão vide Zago *et al.*, 1992 e Gonçalves *et al.*, 2003),

além da mistura ocorrida entre os povos africano, europeu e nativo no continente americano. Tais diferenças genéticas podem determinar, por exemplo, a resposta diferencial a drogas terapêuticas, a maioria das quais testadas em populações norte-americanas e européias (revisado por Tate & Goldstein, 2004). Além disso, a classificação racial com base na pigmentação da pele, a exemplo do que ocorre no Brasil, não parece ter uma forte correlação com a ancestralidade dos indivíduos, o que enfatiza a necessidade de precaução ao se utilizar a pigmentação como marcador de ancestralidade ou ao se extrapolar resultados obtidos em uma população miscigenada para outra (Parra *et al.*, 2004). A realização de estudos comparativos entre populações miscigenadas, como afro-brasileiras e afro-americanas, poderá ter implicações nas pesquisas acerca de estratégias terapêuticas mais específicas e adequadas para doenças complexas ainda sem tratamento definido, como é o caso da anemia falciforme.

Tabela 1: Revisão da literatura sobre a análise de citocinas e outros mediadores de inflamação no plasma/soro de pacientes com anemia falciforme.

Citocinas/outros	População	Resultados (referência)
IL-1, TNF	Norte-americanos	Níveis elevados de ambas as citocinas investigadas (Francis & Haywood, 1992).
TNF-alfa	Venezuelanos	Níveis elevados e correlação inversa com %HbF (Malavé <i>et al.</i> , 1993).
GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-1 (alfa,beta)	Norte-americanos	Correlação inversa entre GM-CSF e %HbF, e direta entre IL-3 e %HbF (Croizat, 1994).
IL-4, IL-6, IL-10	Norte-americanos	Níveis elevados de todas as citocinas investigadas (Taylor <i>et al.</i> , 1997).
Proteínas de fase aguda, beta2-microglobulina, IL's, TNF-alfa	Gregos	Níveis elevados de beta2M, IL-6 e sIL-2R (Bourantas <i>et al.</i> , 1998).
IL-8	Antilhas Holandesas	Níveis elevados durante CVO (Duits <i>et al.</i> , 1998).
Endotelina-1, prostaglandina E2, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, e IL-10	Norte-americanos	Níveis elevados de ET-1 e PGE2 durante CVO (Graido-Gonzalez <i>et al.</i> , 1998).
IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO, SCF (sob tratamento com HU)	Antilhas Holandesas	Somente IL-3 mostrou-se aumentada durante tratamento (Saleh <i>et al.</i> , 1998).
ILs 1, 2 e 12, IFN-gama, sIL-2R	Norte-americanos	Níveis elevados de sIL-2R (Taylor <i>et al.</i> , 1999).
GM-CSF	Árabes	Ausência de correlação entre GM-CSF e %HbF (Haider <i>et al.</i> , 2000).
IL-6, alfa2-macroglobulina	Gregos	Níveis elevados de IL-6 e alfa2M; correlação direta entre os valores de ambas (Makis <i>et al.</i> , 2000).
TNF-alfa	Árabes	Níveis não-detectáveis (Raghupathy <i>et al.</i> , 2000).
IL-8	Brasileiros (NE)	Aumento significativo durante CVO (Gonçalves <i>et al.</i> , 2001).
TNF-alfa	Norte-americanos	Níveis elevados em comparação a controles; sem diferença entre pacientes em repouso e em CVO (Tavakkoli <i>et al.</i> , 2004).
IL-3, IFN-gama, neopterinina	Brasileiros (SE)	Níveis elevados de IL-3; correlação direta com %HbF (Rodrigues <i>et al.</i> , 2006).
IL-8, IL-10, TNF-alfa, PGE2 e outros biomarcadores de inflamação	Brasileiros (SE)	Níveis elevados de TNF-alfa, IL-8 e PGE2; reversão de TNF-alfa e aumento de IL-10 com HU (Lanaro <i>et al.</i> , 2009).

OBJETIVOS

Considerando o exposto anteriormente, o presente trabalho teve como objetivos:

1) Investigar a presença de citocinas pró- e anti-inflamatórias (interleucinas 2, 4, 5 e 10, interferon-gama e TNF-alfa) no plasma de pacientes com anemia falciforme, visando auxiliar no estabelecimento do perfil imunológico destes indivíduos;

2) Determinar a frequência dos polimorfismos ICAM-1 rs5498, PECAM-1 53 G/A e PECAM-1 rs668 em um banco de DNA de pacientes com anemia falciforme, visando dar continuidade aos estudos imunogenéticos realizados em nosso laboratório;

3) Estudar *in vitro* o efeito da hidroxiuréia em células eritróides isoladas de pacientes com anemia falciforme;

3.1) Analisar o efeito da hidroxiuréia na expressão gênica em células eritróides provenientes de pacientes, através da técnica de *differential display* (DD-PCR);

3.2) Comparar a expressão gênica de células eritróides de pacientes que apresentam altos níveis de hemoglobina fetal, com aqueles que apresentam níveis baixos desta proteína.

CAPÍTULO 2

Analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines in
plasma of steady-state sickle cell disease Brazilian
patients and a review of the literature

(Brief Report submitted to Haematologica)

Full title:

Analysis of pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma of steady-state sickle cell disease
Brazilian patients and a review of the literature

Short title:

Cytokines in plasma of steady-state sickle cell disease

Vargas AE^{1,2}, Delgado-Canedo A², Knebel L³, Riveiro V³, Silla LMR³, Chies JAB¹.

1. Laboratory of Immunogenetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2. Laboratory of Molecular and Cellular Cardiology – Instituto de Cardiologia/Fundacao Universitaria de Cardiologia (LCMC-IC/FUC); 3. Department of Hematology and Bone Marrow Transplant, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Keywords: sickle cell disease, cytokines, CBA, flow cytometry

Corresponding author:

José Artur Bogo Chies

Department of Genetics, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, PO BOX 15053

Zip Code 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +55-51-3308-6740

Fax: +55-51-3308-7311.

E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Sickle cell disease (SCD) has been approached as an inflammatory condition in the past decades. The hallmark of the disease is vaso-occlusion (VO), and cytokines seem to be involved in mechanisms that trigger VO. Cytokines, chemokines and other soluble markers of inflammation have been investigated in SCD patients from different populations and the results obtained so far can vary according to the population being considered. We have investigated the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients from southern Brazil by flow cytometry, comparing the obtained results to those found in healthy controls and to previously published data. Our results show increased TNF levels in patients, although the differences between patients and controls were not significant ($p = 0.0644$). We speculate that hydroxyurea could have influenced our results. Studying cytokines in SCD patients from different populations could help to elucidate the role of the immune system on this complex disorder.

Sickle cell disease (SCD) results from a single point mutation at the beta-globin gene (GAG→GIG) and it has been approached as an inflammatory condition in the past decades (1). The hallmark of the disease is vaso-occlusion (VO), which is caused by interactions between plasma proteins, sickled erythrocytes, activated leukocytes, platelets and the endothelium (2).

Cytokines seem to be involved in many of the mechanisms that trigger VO, including endothelium activation, the induction of erythrocyte and neutrophil adhesion to the endothelium, the activation of platelets and the production of endothelin 1 (ET-1), a potent vasoconstrictor and pro-inflammatory agonist (3). The presence of cytokines, chemokines and other soluble markers of inflammation has been investigated in plasma or serum of SCD patients from different populations, during steady state and painful crisis, as well as during hydroxyurea (HU) treatment (Table 1). The results obtained so far can vary according to the population being considered (see, for example, studies reporting tumor necrosis factor – TNF – levels), reflecting the need to be careful when extrapolating the data generated in one population to another, and reinforcing the need to study different populational groups in order to design a more thorough picture of SCD clinical aspects.

In order to contribute to the characterization of the immunological profile of SCD, we have investigated the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in patients from southern Brazil by flow cytometry, comparing the obtained results to those found in healthy controls.

SCD patients being followed at Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) were invited to participate in the present work, which was submitted to and approved by the hospital ethics committee. Healthy controls were recruited at Hospital Sao Lucas, Porto Alegre. Informed consent forms were signed by all participants. Blood samples were

obtained from 22 individuals (11 SCD patients and 11 healthy controls) in BD Vacutainer™ tubes (BD Diagnostics, NJ, USA), which were immediately centrifuged in order to isolate the plasma. Plasma samples were aliquoted and stored at -20°C until manipulation.

The concentration of plasma cytokines was determined by flow cytometry using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA), a multiplex immunoassay which quantitatively measures soluble analytes on the basis of their different fluorescence intensities. The CBA kit employed here allows for the discrimination of interleukins (ILs) 2, 4, 5 and 10, as well as interferon-gamma (IFN) and TNF-alpha. Sample processing and data analysis were performed according to the manufacturer's instructions, and sample data were acquired using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA).

The GraphPad Prism 5 software was used for statistical analysis. Mean and standard error of mean (SEM) values were calculated for SCD patients and healthy controls, and the results were compared by the Student's unpaired two-tailed *t*-test. A *p* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Demographic and clinical data of SCD patients and controls are depicted in Table 2. All the patients were in steady state when blood samples were collected. Also, all of them presented low hematocrit (mean 23.9 %) and hemoglobin values (mean 7.55g/dL), which indicate that every patient presents some level of anemia. Nine out of eleven patients were under HU treatment, and HbF levels were higher after HU treatment (mean values, before 5.75% and after HU 14.25%). Cytokine levels in SCD patients and healthy controls are presented in Table 3.

Previous studies investigating plasma TNF in SCD patients have reported high levels of the cytokine in North-Americans, Venezuelans and Brazilians (4, 5, 6, 7). However, studies

in Greek and Arabic patients have failed to find detectable levels of TNF (8, 9). Furthermore, Lanaro et al (7) have observed that TNF levels were significantly lower in SCD patients using HU, when compared to untreated individuals. Our results show increased TNF levels in SCD patients, although the differences between patients and controls were not statistically significant ($p = 0.0644$). Most of our patients were taking HU, hence we could speculate that this treatment could have influenced the results concerning TNF observed here, taking into consideration the data presented by Lanaro et al (7). However, we were unable to point out a direct correlation between TNF levels and HU intake, which could have been attributed to the fact that several patients report to take HU in an irregular manner (data not shown).

Interestingly, Malavé et al. (5) reported an inverse correlation between %HbF and TNF levels in Venezuelan patients. Considering that most Arabic patients present the Arabic-Indian haplotype, notably associated with higher %HbF, one could speculate that this might have influenced the results obtained by Raghupathy et al. (9). Croizat (10) has observed that low levels of HbF were associated with high plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), while high HbF levels corresponded to undetectable GM-CSF levels. Furthermore, the author has reported a direct correlation between HbF and IL-3 levels. In our study, there was a correlation between %HbF and levels of IFN ($R=0.58$), considering the patients whose HbF values were collected prior to HU treatment ($n=8$).

Levels of IL-2 and IFN had been previously investigated in North-American and Brazilian SCD patients (11, 12). Our results support both of these studies, which have reported no significant differences on the levels of those cytokines, when comparing steady state SCD patients and healthy controls.

Previous studies investigating the levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 have reported conflicting results. While Taylor et al (13) observed high levels of IL-10 in

North-American patients, Graido-Gonzalez et al (14) and Lanaro et al (7) did not find differences in IL-10 levels between patients and controls from North-America and Brazil, respectively. Our results on IL-10 are in agreement with these last reports. On the other hand, our data on IL-4 levels differ from those reported by Taylor et al (13), who have observed high IL-4 levels in a group of North-American patients. The other anti-inflammatory cytokine included in our work, IL-5, had not been investigated in SCD patients before.

A noteworthy fact is that the method we have chose to access plasma cytokine levels in SCD patients is different from most of the other studies cited here. In most cases, plasma cytokines are investigated by ELISA, while in the present work these data were obtained by flow cytometry and the multiplex assay CBA (cytometric bead array). The relevance of these methods was investigated by Hemdan (15), who compared ELISA, CBA and RT-PCR, concluding that the evaluation of cytokines by CBA is relevant and could replace the other methods, both in basic research and diagnostics. Hence, we could assume that the results observed in our group of patients is comparable to those observed by all the aforementioned authors.

As final remarks, we would like to point out that: i) most of the SCD patients investigated here is receiving HU, which could have influenced our results, as reported by Lanaro et al (7); and ii) populational groups investigated here and on the other studies previously mentioned are different, which implicate in differences (such as genetic background, which includes beta-S haplotypes) that could help explain some of the divergent results observed when comparisons were made. Nevertheless, we believe that the study of cytokines in SCD patients from different populations is an important approach in trying to elucidate the role of the immune system on the pathophysiology of this complex

disorder.

Table 1: Review of the literature on cytokine and other mediators of inflammation in SCD patients.

Cytokines/others	Population	Results (reference)
IL-1, TNF	North-americans	Elevated levels of both cytokines (4).
TNF-alpha	Venezuelans	Elevated levels & inverse correlation with %HbF (5).
GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-1 (alpha,beta)	North-americans	Inverse correlation between GM-CSF & %HbF, and direct correlation between IL-3 & %HbF (10).
IL-4, IL-6, IL-10	North-americans	Elevated levels of all cytokines (13).
Acute phase proteins, beta2-microglobulin, IL's, TNF-alpha	Greeks	Elevated levels of beta2M, IL-6 & sIL-2R (8).
IL-8	Dutch Antilles	Elevated levels during VO (16).
Endothelin-1, prostaglandin E2, TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-8, & IL-10	North-americans	Elevated levels of ET-1 & PGE2 during VO (14).
IL-3, IL-6, GM-CSF, EPO, SCF (under HU treatment)	Dutch Antilles	Elevated levels of IL-3 (17).
ILs 1, 2 e 12, IFN-gama, sIL-2R	North-americans	Elevated levels of sIL-2R (11)
GM-CSF	Arabics	No correlation between GM-CSF & %HbF (18)
IL-6, alpha2-macroglobulin	Greeks	Elevated levels of IL-6 & alpha2M; direct correlation between them (19)
TNF-alfa	Arabics	Non-detectable levels (9)
IL-8	Brazilians (northeast)	Elevated levels during VO (20)
TNF-alpha	North-americans	Elevated levels when comparing patients X controls; no difference between steady state and VO (6)
IL-3, IFN-gamma, neopterin	Brazilians (southeast)	Elevated levels of IL-3; direct correlation between IL-3 & %HbF (12)
IL-8, IL-10, TNF-alpha, PGE2 & others	Brazilians (southeast)	Elevated levels of TNF-alpha, IL-8 & PGE2; diminished TNF-alpha & elevated IL-10 under HU (7)

Table 2: Clinical and demographic data of SCD patients and healthy controls.

	SCD patients (n=11)	Controls (n=11)
Gender (female/male)	6/5	7/4
Age* (years)	30.5 (12-49)	40 (22-58)
Hematocrit* (%)	24.5 (18.9 – 30.1)	ND (male: 40 – 50; female: 36 – 45)
Hemoglobin* (g/dL)	7.7 (6.0 – 9.4)	ND (>12.5)
HbF before HU* (%)	5.75 (1.5 - 10.0)	ND (0.2 - 1.7)
HbF after HU* (%)	14.25 (6.5 - 22)#	NA

*Data presented as mean (min-max).

#Data refers to 9 patients.

ND: not determined (reference values).

NA: not applicable.

Table 3: Cytokine levels in SCD patients and healthy controls.

	IFN-gamma (pg/mL)	TNF-alpha (pg/mL)	IL2 (pg/mL)	IL10 (pg/mL)	IL4 (pg/mL)	IL5 (pg/mL)
SCD patients* (n=11)	11.95 ± 1.515	13.38 ± 4.399	6.882 ± 0.5766	7.836 ± 0.6581	5.755 ± 0.6508	2.873 ± 0.1898
Controls* (n=11)	10.14 ± 2.395	4.600 ± 0.8780	6.064 ± 1.779	6.036 ± 1.426	4.318 ± 0.7075	2.491 ± 0.4693
<i>p value</i>	0.5284	0.0644	0.6664	0.2652	0.1507	0.4595

*Data presented as mean ± SEM.

References

1. Chies JAB, Nardi NB. Sick cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses*. 2001 Jul;57(1):46-50.
2. Embury SH. The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation*. 2004 Mar;11(2):101-13.
3. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2000 Aug;79(8):407-13.
4. Francis RB Jr, Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*. 1992 Jul;84(7):611-5.
5. Malavé I, Perdomo Y, Escalona E, Rodriguez E, Anchustegui M, Malavé H et al. Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol*. 1993;90(4):172-6.
6. Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology*. 2004 Feb;9(1):61-4.
7. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009 Feb;85(2):235-42.
8. Bourantas KL, Dalekos GN, Makis A, Chaidos A, Tsiara S, Mavridis A. Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. *Eur J Haematol*. 1998 Jul;61(1):49-54.
9. Raghupathy R, Haider MZ, Azizieh F, D'Souza TM, Abdelsalam R, Adekile AD. Tumor necrosis factor-alpha is undetectable in the plasma of SS patients with elevated Hb F. *Am J Hematol*. 2000 Jun;64(2):91-4.
10. Croizat H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol*.

1994 Jul;87(3):592-7.

11. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z. In vivo production of type 1 cytokines in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1999 Nov;91(11):619-24.

12. Rodrigues L, Costa FF, Saad ST, Grotto HZ. High levels of neopterin and interleukin-3 in sickle cell disease patients. *J Clin Lab Anal.* 2006;20(3):75-9.

13. Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P. Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc.* 1997 Nov;89(11):753-7.

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

15. Hemdan NY. The role of interleukin-12 in the heavy metal-elicited immunomodulation: relevance of various evaluation methods. *J Occup Med Toxicol.* 2008 Nov 6;3:25.

16. Duits AJ, Schnog JB, Lard LR, Saleh AW, Rojer RA. Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. *Eur J Haematol.* 1998 Nov;61(5):302-5.

17. Saleh AW, Duits AJ, Gerbers A, de Vries C, Hillen HF. Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol.* 1998;100(1):26-31.

18. Haider MZ, Raghupathy R, Azizieh F, Abdelsalam R, D'Souza TM, Adekile AD. GM-CSF in sickle cell anemia patients with elevated Hb F. *Acta Haematol.* 2000;102(3):140-3.

19. Makis AC, Hatzimichael EC, Mavridis A, Bourantas KL. Alpha-2-macroglobulin and interleukin-6 levels in steady-state sickle cell disease patients. *Acta Haematol.* 2000;104(4):164-8.

20. Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E et al. Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J*

Med Biol Res. 2001 Oct;34(10):1309-13.

CAPÍTULO 3

ICAM-1 and PECAM-1 polymorphisms in sickle cell disease patients

(manuscrito em preparação)

Full title:

ICAM-1 and PECAM-1 polymorphisms in sickle cell disease patients

Short title:

ICAM-1 and PECAM-1 polymorphisms in SCD

Vargas AE^{1,2}, Delgado-Canedo A², Silla L³, Chies JAB¹.

1. Laboratory of Immunogenetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2. Laboratory of Molecular and Cellular Cardiology – Instituto de Cardiologia/Fundacao Universitaria de Cardiologia (LCMC-IC/FUC); 3. Hematology and Bone Marrow Transplant Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Keywords: sickle cell disease, adhesion molecules, polymorphism, ICAM-1, PECAM-1

Corresponding author:

José Artur Bogo Chies

Department of Genetics, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, PO BOX 15053

Zip Code 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +55-51-3308-6740

Fax: +55-51-3308-7311.

E-mail: jabchies@terra.com.br

Abbreviations

HbF: fetal hemoglobin;

HbS: hemoglobin S;

HU: hydroxyurea;

ICAMs: intercellular adhesion molecules;

PECAM-1: platelet-endothelial cell adhesion molecule 1;

PS: phosphatidylserine;

RBCs: red blood cells;

SCD: sickle cell disease;

SNP: single-nucleotide polymorphism;

SSRE: shear stress responsive element;

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1.

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is currently considered a chronic inflammatory condition, suggesting that genes modulating the immune system are of particular interest when trying to determine which factors influence its clinical outcomes. We studied three polymorphisms of the adhesion molecules ICAM-1 and PECAM-1 in SCD patients and compared with healthy individuals. The polymorphisms were equally distributed between patients and controls ($p>0.05$), suggesting that these variants are not directly associated with SCD. Analyses of polymorphic variants and clinical manifestations showed no significant differences in genotype or allelic frequencies, between severe and moderate cases. Such observations are extremely important in order to establish the role of adhesion molecule polymorphisms in the modulation of this disorder.

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is caused by a single nucleotide substitution (GAT→GTT) in the beta-globin gene, which produces a mutant hemoglobin molecule (HbS) that precipitates under hypoxia and alters the morphology of red blood cells (RBCs). These deformed cells have a reduced lifespan when compared to normal RBCs, so that SCD patients present varying degrees of anemia.

Vaso-occlusive episodes (manifested as painful crisis) are the hallmark of SCD and the main cause of the morbidity associated with the disease. In addition to pain episodes and severe anemia, clinical manifestations of SCD include high incidence of infections, acute chest syndrome and severe damage to multiple organs - including kidneys, lungs and spleen - due to recurrent vaso-occlusion. Even though all SCD patients possess the same genetic mutation as the cause for the disease, they present extremely variable clinical manifestations(1). This clinical heterogeneity has been attributed to environmental, psychosocial and genetic factors - such as fetal hemoglobin (HbF) levels, the alpha-globin genotype and the beta-globin haplotype (2). Moreover, such observations have brought to attention the fact that SCD could not be explained solely by the beta-globin single gene mutation.

The data accumulated along the last decades has pointed to a broader definition of SCD, which is considered today as a chronic inflammatory condition (3; reviewed in 4). The blockage of vessels and arteries, once believed to be triggered by sickled RBCs, is now regarded as a multistep and complex event, in which deformed RBCs, leukocytes, platelets and the endothelium interact with/through inflammatory mediators to cause vaso-occlusion. Early studies *in vitro* have demonstrated the higher adhesion of sickled RBCs to the endothelium when compared to normal RBCs, and these were followed by studies in

murine models showing the occurrence of inflammation in transgenic sickle mice, when submitted to hypoxia (5). Along with those evidences, studies involving monocytes, leukocytes and inflammatory mediators in SCD patients have contributed to the current concept of SCD as a chronic inflammatory condition, where the interactions among sickled RBCs, leucocytes and endothelium play a key role in the clinical picture of the disorder. This idea suggests that a great amount of genetic variants could influence the clinical outcome of SCD. Furthermore, it implies that genes involved in endothelial function and in the modulation of the immune system are of particular interest when trying to determine which factors contribute to differences in the clinical manifestations of this disease.

In spite of such vast amount of evidences, many questions are still to be answered regarding the exact mechanisms involved in vaso-occlusion. One of these questions refers to the role of adhesion molecules in vaso-occlusive episodes. Adhesion molecules are present in a wide variety of cell types, playing an important role in inflammatory processes by mediating the attachment of leukocytes to the endothelium, followed by rolling and transendothelial migration on sites of inflammation. Mature and immature RBCs, as well as reticulocytes, present a number of adhesive receptors through which they interact with leukocytes, platelets and the endothelium, and some of them have been proved to be active in sickled RBCs (reviewed by 6). Studies *in vitro* and in animal models have demonstrated that several adhesion molecules are involved in the interactions between sickled RBCs and the endothelium, such as the integrin $\alpha 5\beta 3$, CD36, fibronectin and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), on the surface of endothelial cells, as well as phosphatidylserine (PS), CD36 and the integrin $\alpha 4\beta 1$ (or VLA-4), on RBCs. Plasma proteins (von Willebrand factor and thrombopondin) also seem to be involved in these interactions. However, the role of these molecules *in vivo*, in humans, still remains to be well established (7, 8). As previously stated,

sickled RBCs are more adherent to the endothelium than normal RBCs, and this adherence has been recently shown to be modulated by genetic polymorphisms at the beta-2 adrenergic receptor gene (ADRB2) and at the gene encoding an isoform of the adenylyl cyclase (ADCY6) (reviewed by 9).

Intercellular adhesion molecules (ICAMs) constitute an immunoglobulin-like sub-family of five members. ICAM-1 (or CD54) is expressed by leukocytes and endothelial cells, playing an important role in the arrest of those cells to activated endothelium by establishing strong bonds with integrins at inflammation sites. The gene for ICAM-1 is located at 19p13, and polymorphisms described in this region have been associated with several inflammatory conditions, including rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and cardiovascular disorders (10-13). The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs5498 at the ICAM-1 gene is located upstream of a splice donor site that produces an alternatively spliced short isoform of the protein (ICAM-1-S). A recent study has suggested that this polymorphism modifies inflammatory immune responses by changing cell-cell interactions, thus regulating apoptosis (14). Neutrophils from SCD patients have been shown to have higher ability to adhere to fibronectin and recombinant ICAM-1, when compared to cells from healthy individuals (15).

Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1 or CD31) is also a member of the immunoglobulin superfamily, being expressed on the surface of monocytes, some T lymphocyte subsets, platelets and endothelial cells. Besides its well-documented role in the transendothelial migration of leukocytes and hematopoietic progenitor cells, malarial parasite binding, and angiogenesis, PECAM—1 also seems to be an important modulator of integrin function. Genetic variants in the PECAM-1 gene (mapped to 17q23) have been associated with atherosclerosis, coronary artery disease, myocardial infarction or coronary

artery stenosis in different ethnic groups (16, 17-19). A C/G substitution (rs668) on PECAM-1 occurs at exon 3, which encodes the first immunoglobulin domain of the molecule, causing an amino acid change and leading to differential immunoreactivity in the mature protein (20). More recently described, the PECAM-1 53 G/A is a SNP at the 5' untranslated region (5'UTR) of the gene that alters a putative shear stress responsive element (SSRE) (17).

In order to contribute to the characterization of the genetic differences underlying the phenotypic diversity observed in SCD, we have focused our work on three polymorphisms described in the genes encoding the adhesion molecules ICAM-1 and PECAM-1 (which are present in leukocytes, platelets and the endothelium): ICAM-1 rs5498 (-1548 A/G, K469E), PECAM-1 53 G/A and PECAM-1 rs668 (373 C/G, L125V). We have investigated the distribution of these polymorphisms in Brazilian SCD patients (51 males and 47 females) and compared the observed frequencies with those found in healthy controls. Furthermore, analyses of these three polymorphic variants and the clinical manifestations of SCD were carried out in order to check for any correlations between the severity of the disease and the polymorphisms studied here.

Materials & Methods

Female patient age ranged from 4 to 62 years, while male patient age range was 4 to 73 years. One male patient was also diagnosed with alpha-thalassemia, while four (04) other patients were heterozygotes SC. Homozygosity for the S allele was confirmed by molecular diagnosis. 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 representatives. Patients were either Afro-Brazilians or admixed individuals. In the present work, the term Afro-Brazilian designates phenotypically black Brazilian individuals. This nomenclature does not consider the individuals' ancestry, but

rather their skin color. Healthy Afro-Brazilian individuals were analyzed as controls for the polymorphisms studied. This project was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre ethics committee. DNA was isolated from peripheral blood cells using a salting out method and samples were stored at -20°C.

Genotyping was performed by RFLP using specific primers previously described (16, 17, 21). 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 1U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Corporation, California, USA).

The number of painful crisis per year (pain rate) has been used as a measure of clinical severity in SCD, and has demonstrated a positive correlation with premature death in patients over 20 years old. Patients were considered to have a severe clinical course when presenting 2 or more painful crisis per year (pain rate \geq 2). A moderate clinical course was defined as incidence of 1 painful episode per year or less (pain rate \leq 1). This classification was based on the period before the patients went on hydroxyurea (HU) treatment.

Results

The genotype distribution and the allelic frequencies in SCD patients and healthy controls are depicted in Table 1. The results demonstrate that both groups present similar frequencies of the polymorphisms studied here ($p>0.05$), suggesting that these variants are not correlated with the disorder.

We have also investigated the distribution of genotypes and alleles in 2 groups of SCD patients: those presenting a severe clinical course, and those whose clinical course was considered mild (Table 2). There were no differences in genotype or allele frequencies when we compared both groups ($p>0.05$). Likewise, when we divided the patients according to

the incidence of cardiac/vascular complications (Table 3), no differences between the groups were found. Nevertheless, homozygotes for the SNP at the ICAM-1 gene, as well as heterozygotes for the PECAM-1 53G/A polymorphism, were only found in the severe group.

Discussion

The pathophysiology of SCD is extremely complex and it seems very likely that the higher adhesiveness of sickled RBCs should involve different mechanisms, depending on the moment, the patient, or even the organ being considered. Studies by Lee et al. (22) support the idea that the modulation of the expression of a single adhesion molecule (CD36, in this case) is not enough to prevent the adhesion of sickled RBCs to the endothelium. Several studies have demonstrated the occurrence of other mechanisms that could also contribute to these episodes (23, 24), indicating the complexity of such events and the need for further investigations in order to determine all the factors involved in vaso-occlusion.

The definition of SCD as an inflammatory condition is currently well-established and widely accepted. Vaso-occlusive episodes, the main characteristic of this disorder, were once solely attributed to the higher adhesion of sickled RBCs to the endothelium, but this idea has been changed by findings that leukocytes, endothelial cells and adhesion molecules could also play a role in such events (25, 26; reviewed by 27). Such concept suggests that a great amount of genetic variants could influence the clinical outcome of the disorder. Furthermore, it implies that genes involved in endothelial function and in the modulation of the immune system are of particular interest when trying to determine which genes, in fact, contribute to differences in the clinical outcome of SCD. Studying polymorphic variants of genes involved in the immune response seems, therefore, an interesting approach to better understand the clinical variability observed in SCD patients.

Few studies have attempted to find an association between polymorphisms on adhesion molecule genes and the clinical aspects of SCD. Taylor et al. (28) studied several variant alleles of VCAM-1 and found that the SNP G1238C might be associated with protection from stroke in Jamaican adults. Hoppe et al. (29), on the other hand, showed that the polymorphism VCAM1 -1594 T>C was associated with stroke risk in African-American children. This study investigated 104 polymorphisms among 65 candidate genes, including 2 polymorphisms at the ICAM-1 gene (K56M and G241R, not approached in our present study) which showed no association with stroke risk. Eyler et al. (30) recently demonstrated that sickled RBCs adhesiveness is modulated by SNPs at the beta- 2 adrenergic receptor gene (ADRB2) and at the gene encoding an isoform of the adenylyl cyclase (ADCY6), concluding that such polymorphisms could account for 88% of the adhesion variability observed in sickled RBCs.

This is, to our knowledge, the first study to investigate the polymorphisms ICAM-1 rs5498, PECAM-1 53 G/A and PECAM-1 rs668 in SCD patients. We have found no association between these variants and the clinical manifestations of SCD studied here. Establishing the role of adhesion molecules in the pathophysiology of SCD, and more specifically how they influence/contribute to the interactions between sickled RBCs, leukocytes and the endothelium during vaso-occlusion, should reveal important targets for SCD treatment. It is more likely that a combination of genes/polymorphisms would better explain the clinical outcome of a complex disorder such as SCD, rather than a single variant in any given gene. Moreover, it is important to have in mind that such gene combinations may vary between different populations, which could have important implications when considering the use of these data to infer prognosis or to determine alternative therapies to SCD patients.

TABLE 1: Genotype distribution and allelic frequencies in patients and controls.

ICAM-1				
rs5498				
	AA	AG	GG	G
Patients (n=95)	54 (0.57)	31 (0.33)	10 (0.10)	0.27
Controls (n=120)	74 (0.62)	37 (0.31)	9 (0.07)	0.23
p				0.66
PECAM-1				
53 G/A				
	GG	GA	AA	A
Patients (n=95)	93 (0.98)	2 (0.02)	absent	0.02
Controls (n=101)	97 (0.96)	4 (0.04)	absent	0.02
p				0.68
PECAM-1				
rs668				
	CC	CG	GG	G
Patients (n=91)	20 (0.22)	71 (0.78)	absent	0.39
Controls (n=83)	19 (0.23)	64 (0.77)	absent	0.38
p				1.00

TABLE 2: Genotype distribution and allelic frequencies in severe and moderate cases.

ICAM-1				
rs5498				
	AA	AG	GG	G
SEVERE (n=57)	38 (0.67)	14 (0.24)	5 (0.09)	0.21
MODERATE (n=13)	8 (0.62)	5 (0.38)	absent	0.19
p		0.49		0.53
PECAM-1				
53 G/A				
	GG	GA	AA	A
SEVERE (n=55)	53 (0.95)	2 (0.05)	absent	0.02
MODERATE (n=14)	14 (1.00)	absent	absent	absent
p		1.00		
PECAM-1				
rs668				
	CC	CG	GG	G
SEVERE (n=54)	13 (0.24)	41 (0.76)	absent	0.38
MODERATE (n=12)	3 (0.25)	9 (0.75)	absent	0.37
p		1.00		1.00

References

1. Ballas SK, Mohandas N. Sick cell red cell microrheology and sick cell blood rheology. *Microcirculation* 2004; 11: 209–225.
2. Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of sick cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Semin Hematol* 2001; 38: 299-306.
3. Chies JAB, Nardi NB Sick cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 2001; 57(1):46-50.
4. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sick cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 2004; 11: 129-151.
5. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sick cell mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 2000; 106(3): 411-420.
6. Johnson C, Telen MJ. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sick cell disease. *Haematologica* 2008; 93(4):481-486.
7. Harlan JM. Introduction: anti-adhesion therapy in sick cell disease. *Blood* 2000; 95:365-367.
8. Okpala I. The intriguing contribution of white blood cells to sick cell disease - a red cell disorder. *Blood Rev* 2004; 18:65-73.
9. Zennadi R, Castro L, Elyer C, Xu K, Ko M, Telen MJ. Role and regulation of sick cell red cell interactions with other cells: ICAM-4 and other adhesion receptors. *Transfus Clin Biol* 2008; 15:23–28.
10. Jiang H, Kleina RM, Niederacherb D, Dub M, Marxa R, Horlitz M et al. C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2002; 84: 171–177.
11. Matsuzawa J, Sugimura K, Matsuda Y, Takazoe M, Ishizuka K, Mochizuki T et al.

Association between K469E allele of intercellular adhesion molecule 1 gene and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Gut* 2003; 52:75–78.

12. Pola R, Flex A, Gaetani E, Flore R, Serricchio M, Pola P. Synergistic effect of 174 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34:881-885.

13. Lee EB, Kim JY, Kim EH, Nam JH, Park KS, Song YW. Intercellular adhesion molecule-1 polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2004; 64: 473–477.

14. Iwao M, Morisaki H, Morisaki T. Single-nucleotide polymorphism g.1548G > A (E469K) in human ICAM-1 gene affects mRNA splicing pattern and TPA-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317(3):729-735.

15. Canalli AA, Franco-Penteado CF, Saad STO, Conran N, Costa FF. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. *Haematologica* 2008; 93(4):605-609.

16. Wenzel K, Baumann G, Felix SB. The homozygous combination of Leu125Val and Ser563Asn polymorphisms in the PECAM1 (CD31) gene is associated with early severe coronary heart disease. *Hum Mutat* 1999; 14(6):545.

17. Elrayess MA, Webb KE, Flavell DM, Syvanne M, Taskinen MR, Frick MH et al. A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G/A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis* 2003; 168:131-138.

18. Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK et al. Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res* 2005; 121:

92-99.

19. Elrayess MA, Webb KE, Bellingan GJ, Whittall RA, Kabir J, Hawe E et al. R643G polymorphism in PECAM-1 influences transendothelial migration of monocytes and is associated with progression of CHD and CHD events. *Atherosclerosis* 2004; 177(1):127-135.

20. Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, et al. Polymorphism of adhesion molecule CD 31 and its role in acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1996; 334:286–291.

21. Vora DK, Rosenbloom CL, Beaudet AL, Cottingham RW. Polymorphisms and linkage analysis for ICAM-1 and the selectin gene cluster. *Genomics* 1994; 21:473-477.

22. Lee K, Gane P, Roudot-Thoraval F, Godeau B, Bachir D, Bernaudin F et al. The nonexpression of CD36 on reticulocytes and mature red blood cells does not modify the clinical course of patients with sickle cell anemia. *Blood* 2001; 98:966-971.

23. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood* 2001; 98:1955-1962.

24. Setty BNY, Kulkarni S, Stuart MJ. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* 2002; 99:1564-1571.

25. Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J et al. 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* 1998; 91:266-274.

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

27. Telen MJ. Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 84-90.

28. Taylor JG 6th, Tang DC, Savage SA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR et al. Variants in the

VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood* 2002; 100:4303-4309.

29. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 2004; 103:2391-2396.

30. Eyster CE, Jackson T, Elliott LE, De Castro LM, Jonassaint J, Ashley-Koch A et al. Beta2-adrenergic receptor and adenylyl cyclase gene polymorphisms affect sickle red cell adhesion. *Brit J Haemat* 2008; 141:105–8.

CAPÍTULO 4

Differential gene expression in erythroid cells from sickle cell disease patients

(manuscrito em preparação)

Full title:

Differential gene expression in erythroid cells from sickle cell disease patients

Short title:

Differential gene expression in sickle cell disease

Vargas AE^{1,2}, Delgado-Canedo A², Knebel L³, Riveiro V³, Silla LMR³, Chies JAB¹.

1. Laboratory of Immunogenetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); 2. Laboratory of Molecular and Cellular Cardiology – Instituto de Cardiologia/Fundacao Universitaria de Cardiologia (LCMC-IC/FUC); 3. Department of Hematology and Bone Marrow Transplant, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Keywords: sickle cell disease, DD-PCR, gene expression, erythroid cells

Corresponding author:

José Artur Bogo Chies

Department of Genetics, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500, PO BOX 15053

Zip Code 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: +55-51-3308-6740

Fax: +55-51-3308-7311.

E-mail: jabchies@terra.com.br

RESUMO

A anemia falciforme (*sickle cell disease*, SCD) decorre de uma mutação pontual (GAG→GIG) que provoca a troca de um aminoácido na cadeia polipeptídica da beta-globina, a qual formará moléculas de hemoglobina S (HbS) que polimerizam sob baixas tensões de oxigênio. Os polímeros de HbS, por sua vez, deformam os eritrócitos, que se tornam rígidos e têm vida útil reduzida. O quadro clínico da SCD se caracteriza pela ocorrência de episódios de vaso-oclusão (VO), ocasionado pela interação de eritrócitos falcêmicos, plaquetas, leucócitos, células do endotélio e fatores solúveis presentes no plasma destes pacientes, caracterizando a SCD como uma condição inflamatória crônica. Altos níveis de hemoglobina fetal (HbF) contribuem para a melhoria do quadro clínico da SCD, e o quimioterápico hidroxiuréia (HU) vem sendo utilizado no tratamento desta doença devido à sua capacidade em aumentar os níveis de HbF nestes pacientes. Os mecanismos pelos quais a HU age na melhoria do quadro clínico da SCD continuam a ser investigados. Nosso objetivo foi investigar a influência da HU sobre a diferenciação e a expressão gênica de células eritróides humanas, diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares isoladas do sangue periférico de pacientes com SCD, através da técnica de DD-PCR. Identificamos genes envolvidos em processos de transcrição gênica e síntese protéica, apoptose, resposta imunológica, transporte de elétrons na mitocôndria e interações proteína-proteína, bem como genes de inibidor de metaloproteinase, de receptor hormonal nuclear e de proteínas integrantes da membrana plasmática. Três genes, cuja função é de particular interesse para este trabalho, foram destacados para discussão: *NACA*, *LXN* e *THRA*.

INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são doenças hematológicas caracterizadas pela expressão de moléculas de hemoglobina mutantes. No caso da anemia falciforme (*sickle cell disease*, SCD), uma mutação pontual no gene que codifica a cadeia de beta-globina tipo beta (GAG→GIG) leva à alteração de um aminoácido na cadeia polipeptídica da proteína, e esta formará moléculas de hemoglobina S (HbS) que polimerizam sob baixas tensões de oxigênio. Os polímeros de HbS, por sua vez, provocam a deformação dos eritrócitos, que se tornam rígidos e têm vida útil reduzida quando comparados às células normais. Desta forma, os pacientes com SCD apresentam graus variáveis de anemia devido à hemólise das células falciformes. Além de anemia, o quadro clínico desta doença se caracteriza pela ocorrência de episódios de vaso-oclusão, manifestados clinicamente como crises de dor. Estes eventos decorrem do bloqueio de vasos e capilares, ocasionado pela interação de eritrócitos falcêmicos, plaquetas, leucócitos, endotélio e fatores solúveis presentes no plasma destes pacientes, caracterizando a anemia falciforme como uma condição inflamatória crônica (revisado por Chies & Nardi, 2001).

Observando-se que altos níveis de hemoglobina fetal (HbF) contribuem para a melhoria do quadro clínico na anemia falciforme, vários estudos foram realizados no intuito de buscar substâncias que induzissem a expressão de HbF nestes pacientes. O quimioterápico hidroxiuréia (HU) é a droga mais promissora a surgir destes estudos (Claster & Vichinsky, 2003). Apesar de sua ampla e bem-sucedida utilização no tratamento de pacientes com SCD, os mecanismos pelos quais a HU age na melhoria do quadro clínico desta doença continuam a ser investigados.

A influência da HU na expressão gênica de pacientes com SCD vem sendo estudada em diferentes tipos celulares e em grupos populacionais distintos. Jison *et al.* (2004) foram

os primeiros a caracterizar o perfil de expressão gênica de células mononucleares isoladas de pacientes com SCD, tratados e não-tratados com HU, utilizando microarranjos de DNA (*DNA microarrays*). Ao comparar os perfis de expressão gênica de pacientes e controles saudáveis, os autores observaram a expressão diferencial de 112 genes, envolvidos no metabolismo de heme, na regulação do ciclo celular, em inflamação e na angiogênese. A HU, no entanto, não afetou significativamente a expressão gênica de leucócitos dos pacientes tratados, sugerindo que esta terapia teria atividade anti-inflamatória direta limitada.

Costa *et al.* (2007) investigaram o perfil de expressão gênica de células da medula óssea de um paciente, antes e depois de tratado com HU. Na comparação dos resultados, foram identificados 147 genes diferencialmente expressos, muitos dos quais estavam envolvidos na regulação dos processos de transcrição e tradução, tais como *EGR-1*, *CENTB1*, *ARHGAP4* e *RIN3*. O efeito da HU em reticulócitos de pacientes também foi investigado, e dentre os genes com expressão alterada encontrados neste trabalho incluem-se *SUDS3*, *FZD5* e *PHC3*, possivelmente associados com a regulação da expressão de globinas (Moreira *et al.*, 2008). Outro trabalho recente investigou a expressão de mediadores de inflamação em leucócitos de pacientes, tratados ou não com HU, e comparou estes dados àqueles obtidos em indivíduos saudáveis (Lanaro *et al.*, 2009). Os autores reportaram alterações significativas na expressão de genes como *iNOS* (expressão reduzida) e *IL-10* (expressão aumentada) em neutrófilos de pacientes sob tratamento com HU, em comparação aos outros grupos estudados.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a influência da HU sobre a diferenciação e a expressão gênica de células eritróides humanas, diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares isoladas do sangue periférico de pacientes com SCD. Desta

forma, utilizou-se a técnica de DD-PCR para comparar os perfis de expressão gênica de células eritróides tratadas com HU *in vitro*, com seus respectivos controles não-tratados. Além disso, realizou-se a comparação entre os perfis de expressão gênica de células eritróides isoladas de pacientes que apresentam níveis basais baixos de HbF *in vivo*, com um paciente cujos níveis de HbF *in vivo* são considerados altos, no intuito de buscar genes diferencialmente expressos que pudessem ajudar a explicar esta diferença nos níveis de HbF observada *in vivo*. Desta maneira, poderia-se colaborar na elucidação dos mecanismos moleculares através dos quais a HU influencia nos níveis de expressão de HbF destes pacientes.

MATERIAIS & MÉTODOS

Pacientes com Anemia Falciforme

O presente projeto foi realizado em colaboração com o Serviço de Hematologia e Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), tendo sido devidamente aprovado pelo Comitê de Ética deste hospital. Pacientes com SCD sob tratamento neste serviço foram convidados a participar desta pesquisa, e confirmaram sua participação no estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Informado (Anexo 1).

Foram coletados de 5 a 10 ml de sangue periférico de 16 indivíduos (n=16), em tubo Vacutainer™ contendo heparina (BD Biosciences, NJ, USA). O soro dos pacientes foi isolado através da centrifugação das amostras, sendo então aliquotado e mantido a -20°C até sua manipulação. Todos os indivíduos coletados apresentaram homozigose para o alelo *HBB*5*, conforme análise molecular realizada em nosso laboratório seguindo o protocolo descrito por Huang *et al.* (1989).

Os dados clínicos e demográficos necessários para a realização deste trabalho foram obtidos através da leitura dos prontuários dos pacientes no HCPA (Tabela 1).

Isolamento de Células Mononucleares, Diferenciação de Células Eritróides in vitro e tratamento com HU

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas através da centrifugação das amostras em gradiente de densidade (Ficoll-Paque™, GE Healthcare, UK), imediatamente após a coleta de sangue. As PBMCs foram, então, cultivadas de acordo com o protocolo de diferenciação de células eritróides em cultura líquida de duas fases, descrito por Amoyal *et al.* (2003). Resumidamente, o protocolo consiste no cultivo de PBMCs em frascos de cultura de 25cm² por aproximadamente 7 dias (fase I). Em seguida, as células aderentes são descartadas, e as não-aderentes são cultivadas em meio contendo 30% de soro fetal bovino, 10% de albumina sérica, dexametasona, eritropoietina (EPO), e *stem cell factor* (SCF) por 6-7 dias (fase II). Ao fim da fase II, observa-se a formação de agregados celulares que correspondem a colônias de progenitores eritróides. Estas células foram, então, transferidas para placas de cultivo de 6 poços e tratadas com diferentes concentrações de HU (100 µM e 125 µM), por até 24h.

Todas as amostras de sangue periférico coletadas (n=16) foram processadas conforme descrito anteriormente, porém nem todas as culturas de PBMCs evoluíram até a fase II do protocolo. Portanto, o DD-PCR foi realizado com amostras derivadas de nove pacientes (n=09).

Extração de RNA

RNA total foi extraído das células eritróides cultivadas utilizando-se o reagente TRIzol

(Invitrogen Corporation, CA, EUA), conforme o protocolo do fabricante. As extrações foram feitas em diferentes períodos de tempo (6h e 24h) após o início do tratamento das culturas com HU.

Síntese de cDNA e differential display (DD-PCR)

A síntese de cDNA e o DD-PCR foram realizados de acordo com a técnica descrita por Liang *et al.* (1993), modificada por Delgado-Cañedo A. (comunicação pessoal).

Para cada amostra de RNA (total de 8 amostras por paciente) foram realizadas 3 reações de transcrição reversa (síntese de cDNA), cada uma delas com um oligo-dT diferente (H-T_{11A}, H-T_{11G} ou H-T_{11C}), o que resultou em 24 amostras de cDNA por paciente (Figura 1). As amostras de cDNA que apresentaram maior rendimento foram usadas para o protocolo de DD-PCR. Desta maneira, foram analisadas amostras controles não-tratadas e amostras tratadas com 100 µM de HU, por 24h, de 7 pacientes. Cada uma destas 42 amostras de cDNA foi, então, submetida à amplificação por PCR com 8 *primers* randômicos, em reações individuais, totalizando 48 reações de PCR por paciente (ou 336 reações, ao todo).

Os produtos gerados pelas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em TBE 1X, com dimensão de 40cm², por 4 a 5 horas, a 150V, 70mA e 10W, utilizando o corante de ácidos nucléicos GelRed™ (Biotium Inc., CA, EUA) que permite a visualização de fragmentos de DNA sob luz ultravioleta.

Os fragmentos com expressão diferencial aparente entre as amostras tratadas e não-tratadas com HU foram recortados dos géis de poliacrilamida e transferidos para tubo de reação de 500 µl, onde permaneceram por 5-10 minutos, para desidratação do gel. A seguir, foram triturados com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e re-hidratados com 300 µl

de água para injeção estéril. As amostras foram, então, incubadas a 100°C por aproximadamente 10 minutos, para eluição do DNA, e logo em seguida, armazenadas a -20°C para posterior manipulação. Foram isolados 180 fragmentos de DNA, os quais foram re-amplificados seguindo-se o mesmo protocolo utilizado para as primeiras reações de PCR. A re-amplificação destes fragmentos gerou 86 amostras adequadas para posterior seqüenciamento.

Seqüenciamento, Identificação e Validação das Seqüências Diferencialmente Expressas

Os 86 fragmentos de DNA obtidos conforme descrito anteriormente, foram tratados por reação enzimática com exonuclease I e fosfatase alcalina (EXO I e SAP, GE Healthcare, UK), e enviados para seqüenciamento no Laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia da UFRGS. As seqüências obtidas foram analisadas através de busca comparativa utilizando o algoritmo BLASTAn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), e a expressão diferencial dos genes encontrados está sendo validada com primers específicos, por PCR em tempo real (*real time PCR*).

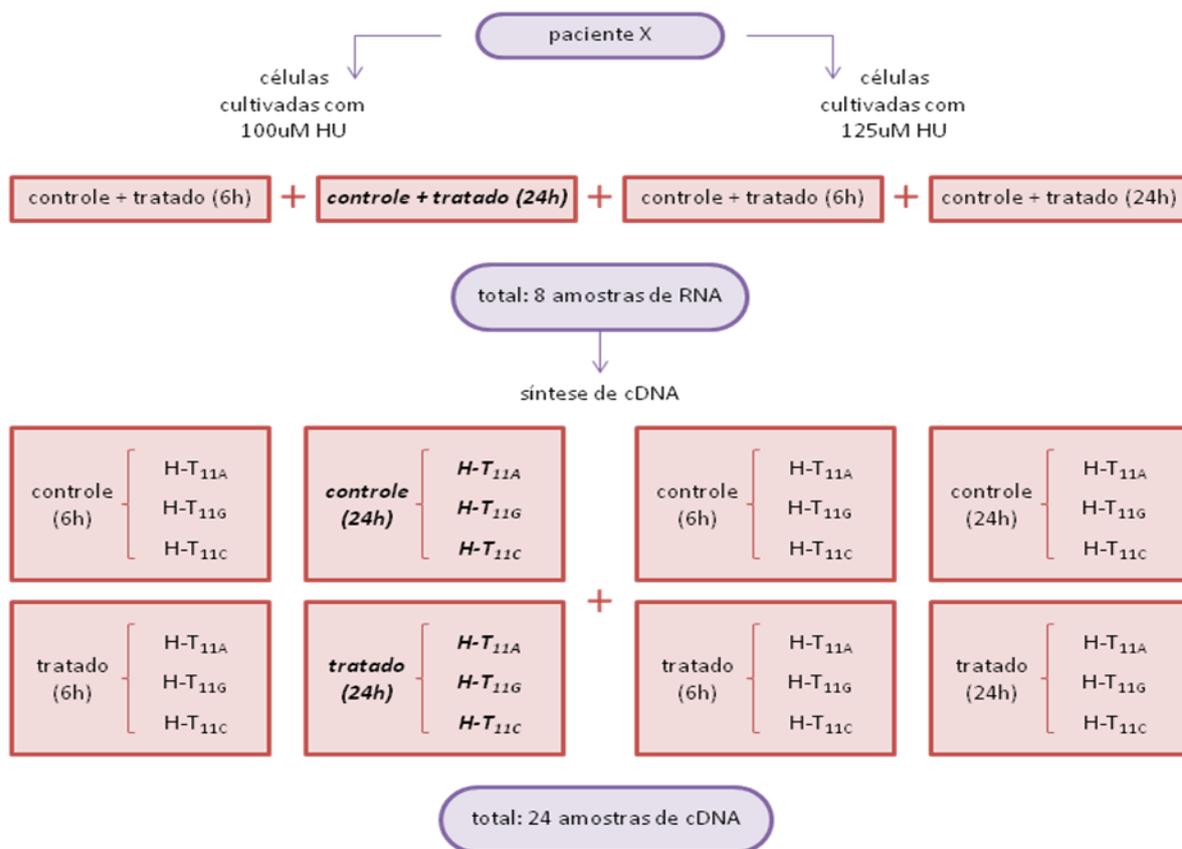


Figura 1: Representação esquemática da obtenção das amostras de cDNA. As amostras em itálico foram utilizadas para o protocolo de DD-PCR.

RESULTADOS & DISCUSSÃO

O seqüenciamento dos fragmentos que apresentaram expressão diferencial aparente gerou 52 seqüências com qualidade suficiente para análises posteriores. A análise por BLASTn resultou em 33 transcritos válidos, dos quais 32 correspondem a genes conhecidos e 1, a uma proteína hipotética (LOC100128084). Dentre os transcritos válidos, 15 corresponderam a genes previamente descritos (Tabela 2) e o restante, a seqüências de genoma mitocondrial e contigs. É importante ressaltar que os resultados apresentados aqui são preliminares e indicativos, uma vez que a expressão diferencial dos genes listados

precisa ser confirmada, etapa que se encontra atualmente em andamento no laboratório.

Dentre os genes encontrados, vários estão envolvidos em processos de transcrição gênica e síntese protéica (*EIF3CL*, *ELP2*, *NACA*, *RPL27A*, *RPL34*, *RPLP2*, *RPS25*), sugerindo intensa proliferação celular nas culturas avaliadas. Além disso, foram encontrados genes envolvidos em processos diversos como apoptose (*BIRC3*), resposta imunológica (*HLA-DPB1*), transporte de elétrons na mitocôndria (*NDUFC2*) e interações proteína-proteína (*TRIM39*), bem como genes de inibidor de metaloproteinase (*LXN*), de receptor hormonal nuclear (*THRA*) e de proteínas integrantes da membrana plasmática (*TMEM188*, *UBAC1*). Três genes, cuja função é de particular interesse para este trabalho, foram destacados a seguir: os genes que codificam a subunidade alfa do complexo associado a polipeptídeos recém-formados (*NACA*), a latexina (*LXN*) e o receptor de hormônio tireóide, alfa (*THRA*).

Complexo associado a polipeptídeos recém-formados – sub-unidade alfa

O complexo associado a polipeptídeos recém-formados (*nascent polypeptide-associated complex*, NAC) parece ser a primeira proteína citosólica a interagir com as cadeias polipeptídicas que emergem dos ribossomos, prevenindo a interação inapropriada destas com outros fatores citoplasmáticos. O NAC é formado por dois polipeptídeos, denominados alfa- e beta-NAC, os quais parecem desempenhar funções distintas dentro do complexo (Beatrix *et al.*, 2000).

Diversos estudos sugerem que a sub-unidade alfa-NAC (*NACA*) atua como co-ativadora transcricional nos processos mediados pelo fator de transcrição c-Jun, o que foi confirmado por Quèlo *et al.* (2002). Os autores observaram que *NACA* necessita interagir com c-Jun para exercer sua função de co-ativadora transcricional, e tal interação é mediada pela ligação de *NACA* ao domínio de ativação N-terminal de c-Jun (Quèlo *et al.*, 2002).

A função de co-ativadora de NACA parece ser importante para o processo de diferenciação de células mesenquimais ao longo de linhagens específicas durante o desenvolvimento embrionário, conforme demonstrado em tecidos muscular e ósseo murinos (Yotov & St-Arnaud, 1996; Moreau *et al.*, 1998). Investigando genes expressos durante o desenvolvimento ósseo, Moreau *et al.* (1998) clonaram o cDNA de NACA em murinos, e caracterizaram seu padrão de expressão. Os autores observaram que a expressão de NACA começa a ser detectada aproximadamente 15 dias após a concepção, concomitantemente com o início da ossificação durante a embriogênese. A proteína é especificamente expressa em osteoblastos diferenciados, nos centros de ossificação, indicando que NACA seria uma co-ativadora transcricional expressa de maneira regulada durante o desenvolvimento ósseo. Através de *splicing* alternativo, NACA se converte em um ativador com capacidade de ligação ao DNA em miotúbulos diferenciados, sugerindo que diferentes isoformas da proteína poderiam estar envolvidas em passos distintos ao longo do processo de diferenciação de células mesenquimais pluripotentes (St-Arnaud, 1998).

Kim *et al.* (2002) observaram uma redução significativa nos níveis de mRNA de NACA e, paralelamente, de proteína, no córtex frontal de pacientes com mal de Alzheimer (AD) e síndrome de Down (DS) com neuropatologia semelhante à AD, sugerindo que níveis reduzidos de NACA poderiam estar envolvidos na patologia de doenças neurodegenerativas. Considerando seu papel de co-ativadora da transcrição mediada por c-Jun, os autores argumentam que a redução de NACA poderia contribuir para o declínio desta maquinaria de transcrição, funcionando ainda como um mecanismo complementar na apoptose mediada por c-Jun. Desta forma, a diminuição dos níveis de NACA resultaria em erros de tradução e na proteólise de proteínas, ao afetar o funcionamento do complexo NAC como um todo.

Al-Shanti *et al.* (2004) sugerem, ainda, que NACA teria atividade anti-proliferativa

sobre linfócitos T CD8+ humanos, *in vitro*. Al-Shanti & Aldahoodi (2006) corroboram esta idéia, ao demonstrar que a inibição de NACA induz a proliferação e a diferenciação de linfócitos T CD8+ humanos, além de aumentar sua citotoxicidade.

Além das funções descritas anteriormente, NACA também parece exercer importante papel na hematopoiese humana, o que é particularmente interessante para o presente trabalho.

Baghdoyan *et al.* (2000) realizaram estudo com o intuito de identificar novos genes induzidos por citocinas, utilizando a linhagem eritroleucêmica humana TF-1, e encontraram duas seqüências conhecidas, sendo uma delas a de NACA. A transcrição de NACA na linhagem TF-1 parece ser regulada de maneira positiva e específica por GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), o que implicaria o envolvimento de NACA na diferenciação de linhagens mielóides (eritrócitos, megacariócitos, granulócitos). Além disso, os autores reportaram que NACA está sendo ativamente transcrita em células CD34+ purificadas, sugerindo seu envolvimento no processo de proliferação durante a hematopoiese. Outra observação importante deste estudo foi que NACA é reprimida durante a diferenciação de células TF-1 em monócitos, sugerindo que sua extinção poderia contribuir para o desenvolvimento da linhagem monocítica. Este foi o primeiro trabalho a descrever uma função biológica para NACA na hematopoiese.

Outro trabalho a correlacionar NACA e hematopoiese humana foi realizado por Lopez *et al.* (2005). Neste estudo, os autores decidiram testar a hipótese levantada pelo trabalho anterior, de que NACA estaria potencialmente envolvida no desenvolvimento e diferenciação de sub-classes da linhagem mielóide humana. Para isso, investigaram o padrão de expressão e o efeito da super-expressão de NACA em células geradas *in vitro*, a partir de células hematopoiéticas CD34+ derivadas de cordão umbilical humano. Os

resultados encontrados revelaram que NACA é mantida durante a diferenciação eritróide destas células *in vitro*, porém sua expressão é suprimida durante os processos de diferenciação megacariocítico e granulocítico. Além disso, a super-expressão de NACA em progenitores hematopoiéticos normais levou à aceleração da diferenciação em células eritróides, enquanto que o silenciamento de NACA através de RNA de interferência (RNAi) na linhagem celular TF-1 ocasionou a redução da expressão de hemoglobina, sugerindo que NACA está envolvida na regulação positiva da diferenciação de células eritróides humanas.

Latexina

A latexina (LXN) é uma proteína citoplasmática endógena, sendo a única inibidora da metaloproteinase carboxipeptidase A (CPA) conhecida em mamíferos. Foi originalmente descrita em ratos, como um marcador molecular de especificação regional durante o desenvolvimento do neocórtex cerebral (Hatanaka *et al.*, 1994). Trabalhos subseqüentes revelaram que a LXN é expressa tanto no sistema nervoso central de ratos, quanto em seu sistema nervoso periférico (Miyasaka *et al.*, 1999).

Liu *et al.* (2000) foram os primeiros a estudar a LXN humana. Os autores observaram altos níveis de expressão de LXN em órgãos como coração, próstata, ovários, rins, pâncreas e cólon, e curiosamente, baixos níveis da proteína foram encontrados no cérebro, revelando um padrão de distribuição tecidual bastante diferente entre a proteína humana e sua homóloga em ratos.

Estudos em linhagens celulares murinas sugerem que a LXN exerce importante papel na diferenciação de osteoblastos e condrócitos, e sua participação neste processo seria mediada pela proteína morfogênica de osso-2 (*bone morphogenic protein-2*, BMP-2), conforme demonstrado em células da linhagem de mioblasto C2C12 e em células

mesenquimais RD-C6 derivadas de embrião (Balint *et al.*, 2003; Kadouchi *et al.*, 2009). A modulação da expressão da LXN pela proteína BMP-2 parece ocorrer via Sox9, um fator de transcrição necessário em sucessivas etapas da condrogênese (Kadouchi *et al.*, 2009). Além disso, estudos indicam que camundongos deficientes em LXN apresentam sensibilidade à dor reduzida, sugerindo o envolvimento desta proteína na transmissão da sensação de dor (Jin *et al.*, 2006).

Aagaard *et al.* (2005) propõem, ainda, que a LXN teria papel importante em processos inflamatórios, uma vez que altos níveis da proteína são observados em macrófagos, onde é induzida juntamente com outros inibidores de proteases e alvos potenciais de proteases.

Estudos revelam que o gene *LXN* apresenta seqüência semelhante ao gene induzido por tazaroteno 1 (*tazarotene-induced gene 1*, TIG1), cuja expressão é baixa ou ausente em diversos tipos de tumor (Youssef *et al.*, 2004). Liang & Van Zant (2008a) relatam que padrões de expressão de LXN semelhantes foram observados em linhagens celulares humanas de leucemia e linfoma, bem como em células isoladas de pacientes com estas doenças, indicando que a LXN poderia estar envolvida na regulação da progressão do câncer, agindo provavelmente como um supressor tumoral.

Para testar a hipótese de que a expressão ectópica de LXN em células tumorais inibiria seu crescimento, Liang & Van Zant (2008b) desenvolveram um vetor de expressão retroviral contendo o gene da LXN, o qual foi utilizado para infectar linhagens murinas de linfoma (WEHI231 e A20) cujos níveis da proteína em estudo são insignificantes. As células de ambas as linhagens apresentaram redução média de crescimento de 48%, quando tratadas com LXN. A inibição do crescimento das linhagens de linfoma pela LXN deveu-se ao aumento da apoptose (cerca de 6 vezes), em comparação aos controles tratados com o

mesmo vetor contendo o gene-repórter *GFP*) e à supressão da proliferação celular (cerca de 2 vezes). Os autores também testaram a capacidade da LXN quanto à inibição do crescimento de linfomas *in vivo*. Injetando células A20 infectadas com o vetor contendo LXN ou GFP em camundongos, verificaram após 2 semanas que a massa tumoral causada pelas células infectadas com o vetor da LXN apresentava metade do volume daquela formada por células tratadas com o vetor contendo GFP. Os resultados observados nestes experimentos são indicativos do papel de supressor de tumor da LXN e sugerem que esta proteína poderia ser eficaz no tratamento destas doenças (Liang & Van Zant, 2008b).

Talvez a característica mais relevante da LXN, no contexto deste trabalho, refira-se à recente observação de que esta proteína influencia o tamanho da população de células-tronco hematopoiéticas (HSCs), em camundongos (Liang *et al.*, 2007). Utilizando duas linhagens de camundongos que diferem na frequência de HSCs, os autores observaram que o gene da LXN é diferencialmente expresso nestes animais. A menor expressão de LXN foi observada na linhagem que apresenta frequência maior de HSCs, levando os autores a sugerir que a LXN agiria como um regulador negativo da população de HSCs, através dos seguintes mecanismos: i) diminuição da replicação de HSCs; e ii) aumento da apoptose de HSCs. Resultados preliminares, apresentados por este grupo de pesquisadores em um congresso internacional, sugerem que a regulação da população de HSCs pela LXN ocorre via rota dependente de NF- κ B (Li *et al.*, 2008).

Considerando o conjunto de resultados obtidos até o momento, Liang & Van Zant (2008a) sugerem que a LXN poderia estar envolvida na senescência do reservatório de células-tronco no organismo de mamíferos, o que teria influência direta sobre a longevidade destes indivíduos. Os autores propõem que a LXN teria efeito sobre os processos de proliferação celular e apoptose, afetando o número e a função das células-tronco. A

redução da frequência de células-tronco teria conseqüências diretas sobre a capacidade de regeneração tecidual frente a situações de estresse, a qual por sua vez estaria intimamente relacionada ao processo de envelhecimento do organismo.

Receptor de hormônio tireóide, alfa

Embora a eritropoietina (EPO) seja reconhecida como o regulador primário da eritropoiese, sabe-se que vários outros hormônios afetam a proliferação de precursores eritróides. Dentre os compostos que demonstraram influenciar a formação de colônias eritróides *in vitro* estão agonistas beta-adrenérgicos, hormônios tireóide, hormônios de crescimento, e várias classes de hormônios esteróides (Popovic *et al.*, 1979).

Os hormônios retinóico e tireóide são efetores importantes da homeostasia, crescimento e diferenciação celulares em vertebrados, agindo diretamente em nível de expressão gênica através de receptores nucleares que se ligam a seqüências específicas de DNA. Os receptores para ácido retinóico e hormônio tireóide apresentam semelhanças estruturais e funcionais significativas, e pertencem a uma grande família de fatores de transcrição denominados receptores nucleares de hormônios (*nuclear hormone receptors*, NHRs). Os NHRs modulam a expressão de genes em resposta a hormônios, e podem atuar como oncogenes (revisado por Sande *et al.*, 1993).

O conjunto de estudos acerca das interações entre os receptores de hormônio tireóide (TRs) e seus ligantes sugere que o TR permanece ligado ao DNA, porém pode existir sob duas conformações mutuamente exclusivas. Na ausência de hormônio, a ligação de um complexo co-repressor (incluindo os co-repressores NCoR, SMRT e SUN-CoR, que ativam histona desacetilases via cascata de interações protéicas) leva à inativação da cromatina e à repressão da transcrição gênica. A ligação de hormônio tireóide (T3), por sua vez, causa a

dissociação dos co-repressores, levando à ligação de co-ativadores e à ativação da transcrição, bem como a abertura local da estrutura da cromatina (revisado por Bauer *et al.*, 1998).

No intuito de investigar a influência do estado endócrino *in vivo* no crescimento de colônias eritróides, Popovic *et al.* (1979) compararam os efeitos de hormônios tireóide e agonistas adrenérgicos em culturas de células da medula óssea de cães. Estas duas substâncias demonstraram aumentar a formação de colônias eritróides, via receptores com propriedades semelhantes, sugerindo um papel fisiológico para estes moduladores no eritropoiese.

Estudando interações protéicas envolvendo TRs, Cheng *et al.* (1997) observaram que múltiplas isoformas de TRs interagem com o fator hematopoiético p45/NF-E2. O p45/NF-E2 é um fator de transcrição inicialmente descoberto como um regulador importante da transcrição da beta-globina em células eritróides, sendo expresso também em células eritroleucêmicas, em progenitores hematopoiéticos, e em células das linhagens eritróide, magacariocítica e mastocítica, bem como em seus precursores. Os autores relataram que o fator p45/NF-E2 potencializou a função de ativação da transcrição de TRs em genes-alvo que não possuem sítios de ligação para p45/NF-E2, o que representa um novo exemplo de *cross talk* positiva. Esta *cross talk* positiva entre TR e NF-E2 é consistente com um papel positivo de ambos T3 e NF-E2 na diferenciação eritróide.

Grande parte do conhecimento sobre a relação entre TRs e eritropoiese foi adquirida com estudos que empregam um gene homólogo ao do receptor de hormônio tireóide alfa (THRA), o oncogene *v-erbA*, do vírus da eritroblastose aviária (*avian erythroblastosis virus*, AEV). A oncoproteína *v-erbA* é uma versão mutante, e independente de ligante, do receptor de T3 de galinhas (*c-erbA/T3R*), que induz a auto-renovação e bloqueia a diferenciação de

progenitores eritróides atuando via c-Kit ativado por *stem cell factor* (SCF). A super-expressão de v-erbA provoca a repressão da transcrição gênica mediada por c-erbA/T3R-alfa, o que parece explicar, pelo menos em parte, o fenótipo de células eritróides transformadas por AEV e a repressão de certos genes específicos de eritrócitos. Além disso, v-erbA parece interferir também em cascatas regulatórias diferentes daquelas reguladas por T3 (revisado por Ghysdael & Beug, 1992).

Schroeder *et al.* (1992a) demonstraram que o receptor endógeno de ácido retinóico (RAR-alfa), em cooperação com c-erbA/T3R-alfa, reverte a transformação provocada por oncogenes, suplantando a auto-renovação induzida por estes ao desencadear a diferenciação terminal de células transformadas em eritrócitos normais. Esta indução de diferenciação foi acompanhada por aumento da expressão de genes eritróides. Os autores observaram, ainda, que RAR-alfa e c-erbA/T3R-alfa exógeno, super-expresso, aboliram o bloqueio da diferenciação causado por v-erbA, enquanto baixos níveis de T3R-alfa não tiveram qualquer efeito, sugerindo que a cooperação funcional entre RAR-alfa e c-erbA/T3R-alfa pode exercer papel na regulação da diferenciação eritróide. Esta hipótese foi investigada pelo mesmo grupo de pesquisadores, que demonstraram que c-erbA/T3R-alfa e RAR-alfa de fato atuam na regulação da diferenciação eritróide normal (Schroeder *et al.*, 1992b).

Dando continuidade ao trabalho deste grupo, Bauer *et al.* (1998) demonstraram pela primeira vez o duplo papel de c-erbA/T3R-alfa na determinação do destino de progenitores hematopoiéticos. Na ausência de seu ligante (T3), c-erbA/T3R-alfa mantém a proliferação celular, acompanhada pelo bloqueio da diferenciação. Após a ligação de T3, o mesmo receptor promove a diferenciação terminal de eritrócitos. Os autores concluem, então, que c-erbA/T3R-alfa age como um *switch* molecular, controlado por T3, na regulação do balanço

entre proliferação e diferenciação de progenitores eritróides.

A importância de T3 e TRs no processo de diferenciação de eritrócitos foi demonstrada também em um modelo murino nocaute (*knockout*, KO) para o gene *THRA*, cuja eritropoiese durante ambas as fases fetal e adulta do desenvolvimento encontra-se comprometida em virtude desta deficiência (Kendrick *et al.*, 2008). Os autores observaram que o número de progenitores eritróides no fígado de fetos KO foi significativamente menor, quando comparado ao valor encontrado em animais normais. Animais KO adultos apresentaram níveis de hematócrito menor, elevados níveis de cortisol (considerando seu envolvimento em estresse eritropoiético, níveis aumentados deste hormônio refletem ativação de mecanismo compensatório para manutenção da produção de eritrócitos) e resposta alterada frente à situação de estresse eritropoiético, representada pela indução de anemia hemolítica. Além disso, culturas de células *ex vivo* revelaram que o baço de animais KO continha maior quantidade de eritroblastos, e poucas células produtoras de hemoglobina, o que reflete a incapacidade de atingir diferenciação eritróide terminal destes indivíduos.

Finalmente, uma ligação entre as cascatas de sinalização desencadeadas por EPO e por T3 foi proposta por Ingley *et al.* (2001). Os autores demonstraram que Lyn (uma tirosina quinase envolvida na sinalização de diferenciação disparada pela ativação do receptor de EPO, EPO-R) interage com a proteína Trip-1 (*thyroid hormone receptor-interacting protein 1*), um regulador da transcrição associado ao receptor de T3 (TR). Uma versão truncada de Trip-1 inibiu a maturação induzida por EPO e a divisão celular iniciada por T3. Agindo como um regulador negativo, esta proteína mutante eliminou Lyn endógena, elevou p27^{Kip1} (um inibidor de ciclo celular) e bloqueou elementos de resposta a T3. Estes dados sugerem que Trip-1 pode modular, simultaneamente, respostas envolvendo receptores nucleares, como

TR, e de citocinas, como EPO-R, fornecendo um elo de ligação entre ambos.

Considerações finais

A expressão diferencial dos três genes discutidos aqui (*NACA*, *LXN* e *THRA*) foi observada em células eritróides tratadas com 100 µM de HU, por 24h. Além disso, o gene *LXN* foi também expresso em uma amostra de células não-tratadas provenientes de um paciente que, independentemente de HU, apresenta altos níveis de HbF. Até onde alcança nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se observa a indução, pela HU, da expressão destes genes em células eritróides humanas derivadas de pacientes com SCD.

Trabalhos anteriores que investigaram a influência da HU na expressão gênica de pacientes com SCD utilizaram PBMCs, células da medula óssea, reticulócitos e leucócitos (Jison *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2007; Lanaro *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2008). Um dos diferenciais deste estudo foi avaliar o efeito da HU *in vitro* durante a indução da diferenciação eritróide de progenitores hematopoiéticos, isolados a partir de PBMCs. Esta metodologia foi escolhida com o objetivo de buscar genes que, sob a modulação da HU nestes progenitores, ajudassem a explicar de que maneira esta droga atua na melhoria do quadro clínico da SCD, uma vez que o aumento nos níveis de HbF atribuído à HU não ocorre em todos os pacientes tratados. Além disso, a comparação dos perfis de expressão gênica de pacientes cujos níveis basais *in vivo* de HbF são considerados baixos com o perfil de um paciente com níveis relativamente altos de HbF (13%) foi realizada com o intuito de buscar genes envolvidos em tais diferenças na produção de HbF *in vivo*, nestes pacientes, independentemente do uso de HU.

A expressão de *NACA* nas condições observadas neste estudo vem corroborar os resultados de trabalhos anteriores, que reportam sua atividade como reguladora positiva da

diferenciação celular eritróide humana. Além disso, confirma que o protocolo de diferenciação de progenitores hematopoiéticos em células eritróides *in vitro*, utilizando HU e demais fatores, foi bem sucedido, pois conforme observaram Lopez *et al.* (2005) a expressão de NACA é mantida durante a diferenciação eritróide, mas abolida nos processos de diferenciação em granulócitos e megacariócitos. Observando que NACA foi diferencialmente expressa em células de pacientes com SCD tratadas com HU, e considerando que NACA é uma co-ativadora transcricional, pode-se sugerir que a ativação de genes envolvidos na diferenciação eritróide durante o tratamento com HU (e que, potencialmente, estariam envolvidos em rotas que levam ao aumento dos níveis de HbF) poderia ocorrer via NACA. Uma perspectiva interessante seria verificar a expressão de HbF nas mesmas condições em que observamos NACA, e investigar se há alguma correlação entre a expressão de ambas as moléculas.

A LXN vem sendo apontada como um supressor tumoral, sugerindo-se inclusive que poderia ser utilizada de maneira bem-sucedida para o tratamento de tumores devido a suas atividades anti-proliferativa e pró-apoptótica (Liang & Van Zant, 2008b). No presente estudo, a expressão diferencial de LXN foi observada em duas situações distintas: em células provenientes de paciente com níveis de HbF baixos *in vivo*, tratadas com 100 μ M de HU, por 24h, *in vitro*; e em células provenientes de paciente com altos níveis de HbF *in vivo* (sem tratamento com HU), não-tratadas *in vitro*. Ao mesmo tempo em que encontramos genes envolvidos em processos de transcrição e tradução, sugerindo que as culturas celulares analisadas estavam em intensa proliferação, observamos a presença de LXN em culturas tratadas e não-tratadas com HU, o que de certa forma é paradoxal, considerando que a LXN está associada ao aumento de apoptose e à diminuição da proliferação celular. Desta forma, e considerando a importância desta proteína na regulação da população de HSCs, conforme

demonstrado em trabalhos já citados, sugere-se que novos estudos sejam conduzidos com o intuito de esclarecer a relação entre níveis de HbF basais, HU, LXN e diferenciação eritróide em pacientes com SCD.

A presença de THRA parece ser fundamental para a manutenção do processo de eritropoiese, conforme demonstrado em estudo feito com camundongos KO para este receptor (Kendrick *et al.*, 2008). Confirmando o papel positivo descrito previamente para T3 e TRs durante a diferenciação eritróide, observamos a expressão diferencial de THRA em culturas de células de pacientes com SCD tratadas com HU, o que mais uma vez comprova a eficiência do protocolo utilizado para a indução da diferenciação de PBMCs em progenitores eritróides. Sendo este o primeiro trabalho a reportar a expressão diferencial deste gene em células de pacientes com SCD tratadas com HU, faz-se necessário investigar com maior detalhe a influência da HU sobre os níveis de THRA, verificando se há correlação entre a concentração de HU e a quantidade de THRA produzido, ou ainda, de que maneira a presença da HU estaria influenciando a expressão de THRA.

Para concluir, é necessário lembrar que a expressão diferencial dos genes listados e discutidos neste trabalho necessita ser confirmada. Os dados gerados pelas análises de *real time-PCR* permitirão, então, que este estudo venha a contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares através dos quais a HU interfere no quadro clínico de pacientes com SCD.

Tabela 1: Dados clínicos e demográficos dos pacientes com anemia falciforme investigados.

Pacientes com anemia falciforme (n=7)	
Idade (anos)#	30,5 (12 – 49)
Mulheres/Homens	3/4
Hemoglobina (g/dL)#	7,7 (6 - 9,4)
Hematócrito (%)#	24,85 (19,6 – 30,1)
Uso de HU (sim/não)*	5/1

Valores apresentados como média (mín – máx);

* Uso não determinado para 1 paciente.

Tabela 2: Resultados da análise de seqüências diferencialmente expressas por BLASTn.

Gene/Seqüência	GeneID	Localização	Atividade/Função da proteína
BIRC3 <i>baculoviral IAP repeat-containing 3</i>	330	11q22	Apoptose
EIF3CL <i>eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C-like</i>	728689	16p11.2	Síntese protéica (tradução)
ELP2 <i>elongation protein 2 homolog</i>	55250	18q12.2	Transcrição gênica
HLA-DPB1 <i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>	3115	6p21.3	Resposta imunológica
LXN <i>latexin</i>	56925	3q25.32	Inibidor de carboxipeptidase
NACA <i>nascent polypeptide-associated complex, alpha subunit</i>	4666	12q23-q24.1	Transcrição gênica; tradução/transporte de proteínas
NDUFC2 <i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2</i>	4718	11q14.1	Transporte de elétrons na mitocôndria
RPL27A <i>ribosomal protein L27a</i>	6157	11p15	Síntese protéica (ribossomo)
RPL34 <i>ribosomal protein L34</i>	6164	4q25	Síntese protéica (ribossomo)
RPLP2 <i>ribosomal protein, large, P2</i>	6181	11p15.5-p15.4	Síntese protéica (ribossomo)
RPS25 <i>ribosomal protein S25</i>	6230	11q23.3	Síntese protéica (ribossomo)
THRA <i>thyroid hormone receptor, alpha</i>	7067	17q11.2	Receptor hormonal nuclear
TMEM188 <i>transmembrane protein 188</i>	255919	16q12.1	Membrana plasmática
TRIM39 <i>tripartite motif-containing 39, transcript variant 1</i>	56658	6p21.3	Interações proteína-proteína
UBAC1 <i>UBA domain containing 1</i>	337867	13q32.3	Membrana plasmática

REFERÊNCIAS

Aagaard A, Listwan P, Cowieson N, Huber T, Ravasi T, Wells CA, Flanagan JU, Kellie S, Hume DA, Kobe B, Martin JL. An inflammatory role for the mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: relationship to cystatins and the tumor suppressor TIG1. *Structure*. 2005 Feb;13(2):309-17.

Al-Shanti N, Aldahoodi Z. Inhibition of alpha nascent polypeptide associated complex protein may induce proliferation, differentiation and enhance the cytotoxic activity of human CD8+ T cells. *J Clin Immunol*. 2006 Sep;26(5):457-64.

Al-Shanti N, Steward CG, Garland RJ, Rowbottom AW. Investigation of alpha nascent polypeptide-associated complex functions in a human CD8(+) T cell ex vivo expansion model using antisense oligonucleotides. *Immunology*. 2004 Jul;112(3):397-403.

Amoyal I, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric analysis of hydroxyurea effects on fetal hemoglobin production in cultures of beta-thalassemia erythroid precursors. *Hemoglobin*. 2003 May;27(2):77-87.

Baghdoyan S, Dubreuil P, Eberlé F, Gomez S. Capture of cytokine-responsive genes (NACA and RBM3) using a gene trap approach. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3750-7.

Balint E, Lapointe D, Drissi H, van der Meijden C, Young DW, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 2003 May

15;89(2):401-26.

Bauer A, Mikulits W, Lagger G, Stengl G, Brosch G, Beug H. The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors. *EMBO J.* 1998 Aug 3;17(15):4291-303.

Beatrix B, Sakai H, Wiedmann M. The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1;275(48):37838-45.

Cheng X, Reginato MJ, Andrews NC, Lazar MA. The transcriptional integrator CREB-binding protein mediates positive cross talk between nuclear hormone receptors and the hematopoietic bZip protein p45/NF-E2. *Mol Cell Biol.* 1997 Mar;17(3):1407-16.

Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001 Jul;57(1):46-50.

Claster S, Vichinsky EP. Managing sickle cell disease. *BMJ.* 2003 Nov 15;327(7424):1151-5.

Costa FC, da Cunha AF, Fattori A, de Sousa Peres T, Costa GG, Machado TF, de Albuquerque DM, Gambero S, Lanaro C, Saad ST, Costa FF. Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2007 Jan;136(2):333-42.

Ghysdael J, Beug H. The leukaemia oncogene v-erbA: a dominant negative version of ligand

dependent transcription factors that regulates red cell differentiation? *Cancer Surv.* 1992;14:169-80.

Hatanaka Y, Uratani Y, Takiguchi-Hayashi K, Omori A, Sato K, Miyamoto M, Arimatsu Y. Intracortical regionality represented by specific transcription for a novel protein, latexin. *Eur J Neurosci.* 1994 Jun 1;6(6):973-82.

Huang SZ, Sheng M, Zhao JQ, Qiu XK, Zeng YT, Wang QS, He MX, Zhu JM, Liu WP, Li WW. Detection of sickle cell gene by analysis of amplified DNA sequences. *Yi Chuan Xue Bao.* 1989;16(6):475-82.

Ingley E, Chappell D, Poon SY, Sarna MK, Beaumont JG, Williams JH, Stillitano JP, Tsai S, Leedman PJ, Tilbrook PA, Klinken SP. Thyroid hormone receptor-interacting protein 1 modulates cytokine and nuclear hormone signaling in erythroid cells. *J Biol Chem.* 2001 Nov 16;276(46):43428-34.

Jin M, Ishida M, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Higashinakagawa T, Ikegami S, Arimatsu Y. Reduced pain sensitivity in mice lacking latexin, an inhibitor of metalloproteinases. *Brain Res.* 2006 Feb 23;1075(1):117-21.

Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, Suffredini AF, Talwar S, Logun C, Raghavachari N, Beigel JH, Shelhamer JH, Danner RL, Gladwin MT. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood.* 2004 Jul 1;104(1):270-80.

Kadouchi I, Sakamoto K, Tangjiao L, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yamaguchi A. Latexin is involved in bone morphogenetic protein-2-induced chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jan 16;378(3):600-4.

Kendrick TS, Payne CJ, Epis MR, Schneider JR, Leedman PJ, Klinken SP, Ingley E. Erythroid defects in TRalpha^{-/-} mice. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3245-8.

Kim SH, Shim KS, Lubec G. Human brain nascent polypeptide-associated complex alpha subunit is decreased in patients with Alzheimer' s disease and Down syndrome. *J Investig Med*. 2002 Jul;50(4):293-301.

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol*. 2009 Feb;85(2):235-42.

Li A, Liang Y, Liu Y, Van Zant G. Latexin Regulates Stem Cell Numbers Via a NF-kappaB-Dependent Pathway. *ASH Annual Meeting Abstracts 2008* 112: 1400.

Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res*. 1993 Jul 11;21(14):3269-75.

Liang Y and Van Zant G (a). Aging stem cells, latexin and longevity. *Exp Cell Res*. 2008 June

10; 314(9): 1962–1972.

Liang Y, Van Zant G (b). Latexin: A Potential Tumor Suppressor. ASH Annual Meeting Abstracts 2008 112: 1805.

Liang Y, Jansen M, Aronow B, Geiger H, Van Zant G. The quantitative trait gene latexin influences the size of the hematopoietic stem cell population in mice. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):178-88.

Liu Q, Yu L, Gao J, Fu Q, Zhang J, Zhang P, Chen J, Zhao S. Cloning, tissue expression pattern and genomic organization of latexin, a human homologue of rat carboxypeptidase A inhibitor. *Mol Biol Rep.* 2000;27(4):241-6.

Lopez S, Stuhl L, Fichelson S, Dubart-Kupperschmitt A, St Arnaud R, Galindo JR, Murati A, Berda N, Dubreuil P, Gomez S. NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation. *J Cell Sci.* 2005 Apr 15;118(Pt 8):1595-605.

Miyasaka N, Hatanaka Y, Jin M, Arimatsu Y. Genomic organization and regulatory elements of the rat latexin gene, which is expressed in a cell type-specific manner in both central and peripheral nervous systems. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 May 21;69(1):62-72.

Moreau A, Yotov WV, Glorieux FH, St-Arnaud R. Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol.* 1998 Mar;18(3):1312-21.

Moreira LS, de Andrade TG, Albuquerque DM, Cunha AF, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Identification of differentially expressed genes induced by hydroxyurea in reticulocytes from sickle cell anaemia patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 May;35(5-6):651-5.

Popovic WJ, Brown JE, Adamson JW. Modulation of in vitro erythropoiesis. Studies with euthyroid and hypothyroid dogs. *J Clin Invest*. 1979 Jul;64(1):56-61.

Quèlo I, Hurtubise M, St-Arnaud R. alphaNAC requires an interaction with c-Jun to exert its transcriptional coactivation. *Gene Expr*. 2002;10(5-6):255-62.

Sande S, Sharif M, Chen H, Privalsky M. v-erbA acts on retinoic acid receptors in immature avian erythroid cells. *J Virol*. 1993 Feb;67(2):1067-74.

Schroeder C, Gibson L, Beug H (a). The v-erbA oncogene requires cooperation with tyrosine kinases to arrest erythroid differentiation induced by ligand-activated endogenous c-erbA and retinoic acid receptor. *Oncogene*. 1992 Feb;7(2):203-16.

Schroeder C, Gibson L, Zenke M, Beug H (b). Modulation of normal erythroid differentiation by the endogenous thyroid hormone and retinoic acid receptors: a possible target for v-erbA oncogene action. *Oncogene*. 1992 Feb;7(2):217-27.

St-Arnaud R. Transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation: the role of coactivators. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1998;8(2):191-202.

Yotov WV and St-Arnaud R. Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev.* 1996 10: 1763-1772.

Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, Kondo Y, Garcia-Manero G, Lotan R, Issa JP. Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. *Cancer Res* 2004;64:2411–2417.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

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” (revisado por Lessin & Jensen, 1974 e Serjeant, 2001). A deformação dos eritrócitos observada na anemia falciforme é resultado da presença da hemoglobina mutante S (HbS) nestas células, a qual polimeriza sob baixas tensões de oxigênio alterando a morfologia celular (Emmel, 1917 e Sherman, 1940 *apud* Lessin & Jensen, 1974; Pauling *et al.*, 1949).

Em um estudo clássico, Pauling *et al.* (1949) revelaram que a molécula de HbS tem carga elétrica diferente daquela apresentada pela molécula de hemoglobina adulta normal (HbA), ao observar que a HbS migra mais lentamente que a HbA quando submetidas à eletroforese. Desta maneira, Pauling *et al.* (1949) descreveram pela primeira vez na literatura a relação causal entre uma proteína anormal e uma enfermidade, caracterizando a anemia falciforme como uma “doença molecular”. Esta migração eletroforética diferencial é conseqüência da substituição de um aminoácido com carga negativa (ácido glutâmico) por um aminoácido neutro (valina) na molécula de HbS (Ingram, 1959), o que ocorre em virtude de uma mutação pontual na posição 6 da cadeia da β -globina (GAG→GTG), conforme demonstrado posteriormente (revisado por Serjeant, 2001).

Após quase cem anos desde sua primeira descrição na literatura, a anemia falciforme continua sendo alvo de diversos estudos que buscam melhor entender e explicar as conseqüências clínicas decorrentes da presença da HbS, dentre as quais destacam-se a anemia severa, a maior susceptibilidade a infecções e as crises de dor provocadas por episódios de vaso-oclusão (VO).

Ao longo destes anos, alguns dos conceitos acerca dos aspectos clínicos observados na anemia falciforme foram revistos e reformulados. Podem ser citados como exemplos

disso a idéia de que os pacientes com anemia falciforme apresentariam algum grau de imunodeficiência (o que explicaria a sua maior susceptibilidade a infecções, quando comparados a indivíduos saudáveis) e a hipótese de que a VO era provocada unicamente por eritrócitos falcêmicos (devido à sua maior rigidez).

Inicialmente atribuída à atrofia do baço (que ocorre devido a sucessivos eventos de VO), a alta frequência de infecções observada nestes pacientes, bem como os próprios episódios de VO, são atualmente melhor explicados pela teoria de que a anemia falciforme é uma condição inflamatória crônica (Chies & Nardi, 2001). Esta idéia começou a tomar forma a partir de estudos dos anos 80, demonstrando que os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme apresentavam adesão anormal ao endotélio vascular, e que havia forte correlação entre a capacidade de adesão dos eritrócitos e a severidade clínica da VO (Hoover *et al.*, 1979; Hebbel *et al.*, 1980). Desde então, estudos *in vitro*, em modelos animais e em pacientes revelaram que a VO é um processo complexo e multifatorial, no qual estão envolvidos não somente os eritrócitos falcêmicos, mas também leucócitos ativados, o endotélio e plaquetas. As interações entre os diferentes tipos celulares que participam da VO são mediadas por moléculas de adesão expressas na superfície das células e presentes na matriz extracelular da vasculatura, além de proteínas presentes no plasma, tais como citocinas e quimiocinas (revisado por Embury, 2004).

Desta forma, propusemo-nos a estudar aspectos imunogenéticos que pudessem contribuir para a elucidação do quadro clínico complexo apresentado por pacientes com anemia falciforme. Ao longo deste trabalho, investigamos a concentração de citocinas pró- e anti-inflamatórias presentes no plasma destes indivíduos, bem como a frequência de polimorfismos em dois genes que codificam moléculas de adesão, *ICAM-1* e *PECAM-1*. Em um trabalho final, também avaliamos a expressão gênica em células eritróides diferenciadas

in vitro, a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) isoladas de pacientes e cultivadas na presença de HU.

A síntese de citocinas é disparada em resposta à ativação celular decorrente de um processo infeccioso/inflamatório. Sob condições fisiológicas normais as citocinas encontram-se geralmente em níveis bastante baixos, ou mesmo indetectáveis. O papel das citocinas na patofisiologia da anemia falciforme vem sendo investigado em diferentes grupos populacionais, e com pacientes sob diferentes condições (em repouso, em crise vaso-oclusiva, sob tratamento com HU ou não), conforme os trabalhos listados na Tabela 1 (Capítulo 1).

Ao investigar amostras de plasma de pacientes com anemia falciforme em tratamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) em relação às citocinas pró-inflamatórias IFN-gama, TNF-alfa e IL-2, e anti-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-10 [Capítulo 2], não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os níveis detectados em pacientes e indivíduos saudáveis (controles). Apesar disso, verificamos que os valores médios de TNF-alfa são maiores nos pacientes do que nos controles (Tabela 3, Capítulo 2). O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho é diferente de dados anteriores, observados em populações norte-americanas, venezuelana e do sudeste brasileiro, que reportaram níveis significativamente maiores de TNF-alfa, IL-4 e IL-10 nestes pacientes (Francis & Haywood, 1992; Malavé *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1997; Tavakkoli *et al.*, 2004; Lanaro *et al.*, 2009). Por outro lado, nossos dados corroboram relatos em pacientes gregos, árabes, norte-americanos e brasileiros, que não apresentaram níveis detectáveis ou elevados de IFN-gama, TNF-alfa, IL-2 e IL-10, em relação a indivíduos saudáveis (Bourantas *et al.*, 1998; Graidó-Gonzalez *et al.*, 1998; Raghupathy *et al.*, 2000; Tavakkoli *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006; Lanaro *et al.*, 2009).

Apesar de utilizarmos metodologia diferente dos demais trabalhos para acessar a concentração de citocinas no plasma de pacientes com anemia falciforme (citometria de fluxo com CBA X ELISA), podemos assumir que os resultados observados no grupo de pacientes investigado aqui são comparáveis aos demais relatos da literatura sobre o tema, uma vez que em estudo comparando os métodos citados o autor conclui que a avaliação do perfil de citocinas por CBA é relevante e pode substituir os demais métodos avaliados (ELISA, CBA e RT-PCR), tanto em pesquisa básica quanto em diagnóstico (Hemdan, 2008).

Na tentativa de explicar os resultados diferentes observados no presente estudo, podemos sugerir duas possibilidades: i) o grupo de pacientes investigado aqui está sob tratamento com HU, e este medicamento afeta os níveis de citocinas destes indivíduos, conforme relatado por Lanaro *et al.* (2009); ii) os grupos populacionais investigados nos diferentes trabalhos são distintos, o que implica, por exemplo, em diferenças haplotípicas; conforme previamente comentado, o haplótipo associado ao alelo *HBB*5* pode influenciar nos níveis de HbF e estes, por sua vez, apresentaram correlação com os níveis de TNF-alfa observados em pacientes com anemia falciforme. Sendo assim, podemos especular que o haplótipo *HBB*5* seria um modulador indireto dos níveis de citocinas (ou, pelo menos, de TNF-alfa) observados em diferentes grupos populacionais.

Em outro trabalho que abordou aspectos imunogenéticos de pacientes com anemia falciforme [Capítulo 3], estudamos a frequência de polimorfismos nos genes que codificam as moléculas de adesão ICAM-1 e PECAM-1. Estudos *in vitro* e em modelos animais sugerem o envolvimento de diversas moléculas de adesão nas interações entre eritrócitos e endotélio vascular que, potencialmente, poderiam contribuir para o processo de VO, característico na anemia falciforme (revisado por Harlan, 2000, Hebbel *et al.*, 2004 e Okpala, 2004). Além disso, eritrócitos maduros e imaturos, além de reticulócitos, possuem

receptores para moléculas de adesão, alguns dos quais encontram-se ativados nos eritrócitos falcêmicos (revisado por Johnson & Telen, 2008). Desta forma, especulamos que polimorfismos alterando a expressão e/ou o funcionamento de moléculas de adesão poderiam contribuir para a modulação do quadro clínico de pacientes com anemia falciforme.

Até o momento, poucos estudos investigaram a relação entre polimorfismos em moléculas de adesão e aspectos clínicos da anemia falciforme (Taylor *et al.*, 2002; Hoppe *et al.*, 2004; Eyler *et al.*, 2008). Este foi o primeiro estudo a investigar a frequência e a associação dos polimorfismos ICAM-1 rs5498, PECAM-1 53 G/A and PECAM-1 rs668 com manifestações clínicas observadas em pacientes com anemia falciforme. Nossos resultados indicam que estes polimorfismos estão igualmente distribuídos no grupo de pacientes estudados e no grupo de controles saudáveis. Além disso, não observamos relação entre a presença dos polimorfismos e a gravidade do quadro clínico da anemia falciforme.

Estabelecer o papel das moléculas de adesão na patofisiologia da anemia falciforme e, mais especificamente, como elas modulam as interações entre eritrócitos falcêmicos, leucócitos e o endotélio durante episódios de VO, poderá revelar alvos importantes para o tratamento destes pacientes. Acreditamos ser mais provável que uma ampla combinação de genes/variantes polimórficas venha a explicar melhor as características clínicas de uma doença complexa como a anemia falciforme, ao invés de uma única variante de um determinado gene. Além disso, devemos considerar que a combinação de genes, neste caso, poderá variar de acordo com a população sendo analisada, a exemplo do que ocorre com o haplótipo associado ao alelo *HBB**S. Este fato poderia ter implicações importantes ao considerarmos o uso destes dados para inferir prognósticos, ou para desenvolver terapias alternativas para estes pacientes.

Além do estudo do perfil imunogenético de pacientes com anemia falciforme, outra abordagem utilizada neste trabalho foi o estudo da expressão gênica em células eritróides, diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) isoladas de pacientes e cultivadas na presença de HU [Capítulo 4].

A influência da HU na expressão gênica de pacientes com anemia falciforme foi primeiramente estudada por Jison *et al.* (2004), que caracterizaram o perfil de expressão gênica de PBMCs isoladas de pacientes tratados ou não com HU, comparados entre si e com controles saudáveis. Os autores observaram a expressão diferencial de 112 genes, envolvidos em processos como inflamação e angiogênese, dentre outros, ao comparar pacientes e controles. A HU, no entanto, não afetou significativamente a expressão gênica de leucócitos.

O efeito da HU na expressão gênica de células da medula óssea (Costa *et al.*, 2007) e em reticulócitos de pacientes (Moreira *et al.*, 2008) também foi investigado. Outro trabalho recente investigou a expressão de mediadores de inflamação em leucócitos de pacientes, tratados ou não com HU (Lanaro *et al.*, 2009). Os autores observaram alterações significativas na expressão de genes como *iNOS* (expressão reduzida) e *IL-10* (expressão aumentada) em neutrófilos de pacientes sob tratamento com HU, em comparação aos outros grupos estudados.

Em nosso estudo, investigamos amostras provenientes de 7 pacientes através da técnica de DD-PCR e observamos a expressão diferencial de 15 genes conhecidos, envolvidos nos processos de transcrição e tradução, apoptose, resposta imunológica e transporte de elétrons na mitocôndria, bem como na inibição de metaloproteinase, na resposta a hormônios e na constituição da membrana plasmática (Tabela 1, Capítulo 4). A expressão diferencial destes genes necessita, ainda, ser confirmada através de *real time-PCR*

e, portanto, os resultados discutidos aqui são preliminares e indicativos.

Considerando o tema deste trabalho, escolhemos discutir 3 dos genes encontrados, com base em sua função: *NACA*, *LXN* e *THRA*. A expressão diferencial destes genes foi observada em células eritróides tratadas com 100 μ M de HU, por 24h. Além disso, o gene *LXN* foi também expresso em uma amostra de células não-tratadas provenientes de um paciente que, independentemente de HU, apresenta altos níveis de HbF. A expressão de *NACA* e *THRA* nas condições citadas corrobora resultados de trabalhos anteriores, que apontam *NACA* como reguladora positiva da diferenciação celular eritróide humana, e descrevem o papel positivo de T3 e TRs durante a diferenciação eritróide. A *LXN*, por sua vez, está associada ao aumento de apoptose e à diminuição da proliferação celular. Desta forma, sua expressão durante a indução de diferenciação celular é paradoxal, uma vez que durante este processo podemos observar intensa proliferação celular.

O conceito da anemia falciforme como uma condição inflamatória crônica e a definição da VO como um evento multifatorial, onde interagem leucócitos, eritrócitos, endotélio e proteínas do plasma e da matriz extracelular, implicam que vários genes (e, por extensão, variantes genéticas), diferentes tipos celulares e moléculas, podem influenciar as manifestações clínicas desta doença. Portanto, o estudo de elementos envolvidos na resposta imunológica parece ser uma abordagem interessante para melhor entender a variabilidade observada no quadro clínico de diferentes pacientes com anemia falciforme. Além disso, a crescente utilização da HU como tratamento para estes pacientes torna necessária a busca por melhor entendimento acerca dos mecanismos pelos quais esta droga atua, influenciando o quadro clínico da anemia falciforme.

A intenção deste trabalho foi estudar aspectos imunogenéticos que pudessem auxiliar na melhor compreensão do envolvimento do sistema imunológico na anemia

falciforme, bem como investigar a influência da HU sobre a expressão gênica de células eritróides destes pacientes. O conjunto dos dados obtidos aqui contribui para o desenho do perfil imunogenético destes pacientes, o qual vem sendo traçado em diferentes populações, e complementa os estudos acerca da modulação da expressão gênica exercida pela HU, que buscam elucidar os mecanismos moleculares através dos quais a HU atua na melhoria do quadro clínico de pacientes com anemia falciforme. Nosso objetivo se completa à medida em que as sugestões e perspectivas resultantes deste trabalho venham a contribuir para a melhor compreensão do quadro clínico complexo desta doença e, potencialmente, gerar alternativas para o tratamento e a busca de melhor qualidade de vida para estes pacientes.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Behar E, Chao NJ, Hiraki DD, Krishnaswamy S, Brown BW, Zehnder JL, Grumet FC (1996) Polymorphism of adhesion molecule CD31 and its role in acute graft-versus-host disease. N Engl J Med 334(5):286-291.
- Blankenberg S, Barboux S, Tired L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis 170(2):191-203.
- Blau CA, Constantoulakis P, Shaw CM and Stamatoyannopoulos (1993) Fetal hemoglobin induction with butyric acid: efficacy and toxicity. Blood 81:529-537.
- Bourantas KL, Dalekos GN, Makis A, Chaidos A, Tsiara S, Mavridis A (1998) Acute phase

- proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. *Eur J Haematol* 61(1):49-54.
- 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.
- Casals-Pascual C, Allen S, Allen A, Kai O, Lowe B, Pain A, Roberts DJ (2001) Short report: codon 125 polymorphism of CD31 and susceptibility to malaria. *Am J Trop Med Hyg* 65(6):736-737.
- 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.
- Chies JAB, Nardi NB (2001) Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Medical Hypotheses* 57(1):46-50.
- Claster S and Vichinsky EP (2003) Managing sickle cell disease. *BMJ* 327:1151-1155.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT and Schechter AN (2003) Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation

of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest* 111:231-239.

Costa FC, da Cunha AF, Fattori A, de Sousa Peres T, Costa GG, Machado TF, de Albuquerque DM, Gambero S, Lanaro C, Saad ST, Costa FF (2007). Gene expression profiles of erythroid precursors characterise several mechanisms of the action of hydroxycarbamide in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 136(2):333-42.

Croizat H (1994) Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. *Br J Haematol* 87(3):592-597.

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).

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.

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.

Delgado-Cañedo A, Chies JAB and Nardi NB (2005) Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells - a model based on iron availability signalling. *Med Hypotheses* 65(5):932-6.

- Dresch C (2002) Determinação da capacidade imunológica de indivíduos com anemia falciforme. Dissertação de mestrado PPG Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 118 pp.
- 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.
- Duits AJ, Schnog JB, Lard LR, Saleh AW, Rojer RA (1998) Elevated IL-8 levels during sickle cell crisis. *Eur J Haematol* 61(5):302-305.
- 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.
- Elrayess MA, Webb KE, Bellingan GJ, Whittall RA, Kabir J, Hawe E, Syväne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Pasternack A, Miller GJ, Humphries SE (2004) R643G polymorphism in PECAM-1 influences transendothelial migration of monocytes and is associated with progression of CHD and CHD events. *Atherosclerosis* 177(1):127-135.
- Elrayess MA, Webb KE, Flavell DM, Syväne M, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Pasternack A, Jukema JW, Kastelein JJ, Zwinderman AH, Humphries SE (2003) A novel functional polymorphism in the PECAM-1 gene (53G/A) is associated with progression of atherosclerosis in the LOCAT and REGRESS studies. *Atherosclerosis* 168:131-138.
- Embury SH (2004) The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion. *Microcirculation* 11:101-113.
- 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.

- Eyler CE, Jackson T, Elliott LE, De Castro LM, Jonassaint J, Ashley-Koch A, Telen MJ (2008) Beta2-adrenergic receptor and adenylate cyclase gene polymorphisms affect sickle red cell adhesion. *Brit J Haemat* 141:105–108.
- 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.
- Fang L, Wei H, Chowdhury SH, Gong N, Song J, Heng CK, Sethi S, Koh TH, Chatterjee S (2005) Association of Leu125Val polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene & soluble level of PECAM-1 with coronary artery disease in Asian Indians. *Indian J Med Res* 121: 92-99.
- 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.
- Francis RB Jr, Haywood LJ (1992) Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* 84(7):611-5.
- Gelpi AP (1973) Migrant populations and the diffusion of the sickle-cell gene. *Ann Intern Med* 79:258-264.
- Gladwin MT, Shelhamer JH, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Nichols JS, Link B, Patel DB, Jankowski MA, Pannell LK, Schechter AN and Rodgers GP (2002) Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 116:436-

444.

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.

Gonçalves MS, Queiroz IL, Cardoso SA, Zanetti A, Strapazoni AC, Adorno E, Albuquerque A, Sant'Ana A, dos Reis MG, Barral A, Barral Netto M (2001) Interleukin 8 as a vaso-occlusive marker in Brazilian patients with sickle cell disease. *Braz J Med Biol Res* 34(10):1309-1313.

Graido-Gonzalez E, Doherty JC, Bergreen EW, Organ G, Telfer M, McMillen MA (1998) Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood* 92(7):2551-2555.

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 (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, Osarogiagbon R and Kaul D (2004) The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11:129-151.
- Hemdan NY (2008) The role of interleukin-12 in the heavy metal-elicited immunomodulation: relevance of various evaluation methods. *J Occup Med Toxicol* 3:25.
- Herrick JB (1910) Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* 6:517-521.
- Ho JA, Pickens CV, Gamsick MP, Colvin OM and Ware RE (2003) In vitro induction of fetal hemoglobin in human erythroid progenitor cells. *Exp Hematol* 31:586–591.
- 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.
- Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, Girard T, Vichinsky E, Styles L; CSSCD Investigators (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 103:2391-2396.
- 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. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/populacao/censo2000_populacao.pdf (Março/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.
- Iwao M, Morisaki H, Morisaki T (2004) Single-nucleotide polymorphism g.1548G > A (E469K) in human ICAM-1 gene affects mRNA splicing pattern and TPA-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 317(3):729-735.
- Jiang H, Klein RM, Niederacher D, Du M, Marx R, Horlitz M, Boerrigter G, Lapp H, Scheffold T, Krakau I, Gülker H (2002) C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 84(2-3):171-177.
- Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, Suffredini AF, Talwar S, Logun C, Raghavachari N, Beigel JH, Shelhamer JH, Danner RL, Gladwin MT (2004) Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood* 104(1):270-280.
- Johnson C, Telen MJ (2008) Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. *Haematologica* 93(4):481-486.
- Kikuchi M, Looareesuwan S, Ubalee R, Tasanor O, Suzuki F, Wattanagoon Y, Na-Bangchang K, Kimura A, Aikawa M, Hirayama K (2001) Association of adhesion molecule PECAM-1/CD31 polymorphism with susceptibility to cerebral malaria in Thais. *Parasitol Int* 50(4):235-239.
- 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, 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.
- 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.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF (2009) Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* 85(2):235-242.
- 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 EB, Kim JY, Kim EH, Nam JH, Park KS, Song YW (2004) Intercellular adhesion molecule-1 polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 64: 473–477.
- 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.

- 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.
- Listì F, Candore G, Lio D, Cavallone L, Colonna-Romano G, Caruso M, Hoffmann E, Caruso C (2004) Association between platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) polymorphisms and acute myocardial infarction: a study in patients from Sicily. *Eur J Immunogenet* 31(4):175-178.
- Low JH, Williams FA, Yang X, Cullen S, Colley J, Ling KL, Armuzzi A, Ahmad T, Neville MJ, Dechairo BM, Walton R, Lench NJ, Jewell DP (2004) Inflammatory Bowel Disease Is Linked to 19p13 and Associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* 10:173–181.
- Mader SS (1997) *Inquiry into Life*. 8th Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- 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.
- Malavé I, Perdomo Y, Escalona E, Rodriguez E, Anchustegui M, Malavé H, Arends T (1993) Levels of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. *Acta Haematol* 90(4):172-176.
- Matsuzawa J, Sugimura K, Matsuda Y, Takazoe M, Ishizuka K, Mochizuki T, Seki SS, Yoneyama O, Bannai H, Suzuki K, Honma T, Asakura H (2003) Association between

- K469E allele of intercellular adhesion molecule 1 gene and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Gut* 52(1):75-78.
- 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.
- Moreira LS, de Andrade TG, Albuquerque DM, Cunha AF, Fattori A, Saad ST, Costa FF (2008) Identification of differentially expressed genes induced by hydroxyurea in reticulocytes from sickle cell anaemia patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(5-6):651-655.
- 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.
- Muller WA (2002) Leukocyte-Endothelial Cell Interaction in the Inflammatory Response. *Lab Invest* 82: 521-533.
- Nagel RL and Fleming AF (1992) Genetic epidemiology of the beta s gene. *Baillieres Clin Haematol* 5(2):331-365.
- 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.

- Nejentsev S, Laaksonen M, Tienari PJ, Fernandez O, Cordell H, Ruutinen J, Wikstroim J, Pastinen T, Kuokkanen S, Hillert J, Ilonen J (2003) Intercellular Adhesion Molecule-1 K469E Polymorphism: Study of Association With Multiple Sclerosis. *Hum Immunol* 64, 345–349.
- Newman PJ, Newman DK (2003) Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6):953-964.
- 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.
- Parra EJ, Kittles RA and Shriver MD (2004) Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. *Nat Genet* 36(11):S54-S60.
- 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.

Pola R, Flex A, Gaetani E, Flore R, Serricchio M, Pola P (2003) Synergistic effect of 174 G/C

polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and 469 E/K polymorphism of the intercellular adhesion molecule-1 gene in Italian patients with history of ischemic stroke. *Stroke* 34:881-885.

Raghupathy R, Haider MZ, Azizieh F, D'Souza TM, Abdelsalam R, Adekile AD (2000) Tumor

necrosis factor-alpha is undetectable in the plasma of SS patients with elevated Hb F. *Am J Hematol* 64(2):91-94.

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.

Rodrigues L, Costa FF, Saad ST, Grotto HZ (2006) High levels of neopterin and interleukin-3 in

sickle cell disease patients. *J Clin Lab Anal* 20(3):75-79.

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.

Sasaoka T, Kimura A, Hohta SA, Fukuda N, Kurosawa T, Izumi T (2001) Polymorphisms in the

platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gene, Asn563Ser and Gly670Arg, associated with myocardial infarction in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 947:259-270.

Serjeant GR (2001) The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol* 112:3-18.

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.

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.

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.

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.

Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ and the Multicenter Study of Hydroxyurea (1997) Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: Determinants of Response to Hydroxyurea. *Blood* 89:1078-1088.

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.

Tate SK, Goldstein DB (2004) Will tomorrow's medicines work for everyone? *Nat Genet* 36(11):S34-S42.

Tavakkoli F, Nahavandi M, Wyche MQ, Perlin E (2004) Plasma levels of TNF-alpha in sickle

- cell patients receiving hydroxyurea. *Hematology* 9(1):61-64.
- Taylor JG 6th, Tang DC, Savage SA, Leitman SF, Heller SI, Serjeant GR, Rodgers GP, Chanock SJ (2002) Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood* 100(13):4303-4309.
- Taylor SC, Shacks SJ, Qu Z, Wiley P (1997) Type 2 cytokine serum levels in healthy sickle cell disease patients. *J Natl Med Assoc* 89(11):753-757.
- 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.
- Vargas AE, Silva MAL, Silla L, Chies JAB (2005) Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens* 66(6):683-90.
- 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.
- Watson J (1948) A study of sickling of young erythrocytes in sickle cell anemia. *Blood* 3:465-469.
- Weatherall DJ (1997) ABC of clinical haematology: The hereditary anaemias. *BMJ* 314:492.
- Wenzel K, Baumann G, Felix SB (1999) The homozygous combination of Leu125Val and Ser563Asn polymorphisms in the PECAM1 (CD31) gene is associated with early severe coronary heart disease. *Hum Mutat* 14(6):545.
- Xu J and Zimmer DB (1998) Differential regulation of A gamma and G gamma fetal hemoglobin mRNA levels by hydroxyurea and butyrate. *Exp Hematol* 26:265-272.

Yang Y, Cheng L, Ripen N, He M, Chang Z, Wu T (2007) Association of G+1688A polymorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 gene with myocardial infarction in the Chinese Han population. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27(5):520-523.

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.

Zennadi R, Castro L, Eyler C, Xu K, Ko M, Telen MJ (2008) Role and regulation of sickle red cell interactions with other cells: ICAM-4 and other adhesion receptors. *Transfus Clin Biol* 15:23–28.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos da hidroxiuréia na diferenciação e expressão gênica de células eritróides humanas: implicações para o tratamento da anemia falciforme.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A anemia falciforme é determinada por uma alteração genética que provoca a deformação das células sanguíneas dos pacientes. O quadro clínico apresentado por estas pessoas é influenciado por fatores do ambiente no qual o indivíduo se encontra e também por fatores genéticos.

A hidroxiuréia é um medicamento amplamente utilizado no tratamento desta doença porque promove a melhoria do quadro clínico dos pacientes. Apesar disso, não se sabe exatamente como a hidroxiuréia age no organismo.

Este estudo está sendo realizado para tentar identificar os mecanismos de ação da hidroxiuréia na diferenciação e na expressão de hemoglobina fetal nas células eritróides dos pacientes com anemia falciforme.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Será coletada uma amostra de sangue. Desta amostra, serão isoladas as células vermelhas e o soro, que serão utilizados para análise neste projeto. A partir deste sangue também será extraído DNA, o qual será utilizado para a análise de polimorfismos de genes que possam estar associados ao quadro clínico observado nesta doença. O uso do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Como o presente trabalho visa identificar os mecanismos de ação da hidroxiuréia na diferenciação e na expressão de hemoglobina fetal nas células vermelhas dos pacientes com anemia falciforme, poderá identificar novos alvos para a utilização de medicamentos menos tóxicos que a hidroxiuréia no tratamento desta doença;

2. Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço do conhecimento sobre a anemia falciforme, e mais especificamente contribuindo para o desenvolvimento futuro de tratamentos mais específicos e menos agressivos.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Comparecer ao hospital;

Realizar uma coleta de sangue, que pode causar dor temporária e/ou um hematoma.

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em 2009. No entanto, é possível que outros fatores relacionados ao quadro clínico da anemia falciforme possam vir a ser analisados mais adiante.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE:

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um X apenas 1 das opções abaixo:

() Autorizo o uso do material coletado para esta pesquisa.

() Autorizo uso e estoque do material coletado para esta pesquisa e para a análise de outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Nome do paciente: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do paciente ou do responsável legal: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 200__.

Pesquisador Responsável no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Dra. Lúcia Silla

Pesquisadores Responsáveis no Departamento de Genética da UFRGS: Prof. José Artur Bogo Chies, Andréia Vargas (aluna de doutorado).

Telefone para contato: (51) 3308-6740 (Prof. José Artur Bogo Chies)