



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL
NAS CRISES VASOCLUSIVAS DAS DOENÇAS
FALCIFORMES**

Nome: Paulo Roberto Merisio

Orientadora: Mara Albonei Dudeque Pianovski

**CURITIBA
2012**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que, mesmo com as adversidades da vida, correm em busca de seus sonhos, e que acabam vencendo barreiras e transpondo horizontes para alcançá-los. Às pessoas que ainda acreditam na vida e que esse mundo possa ser melhor. Às pessoas autênticas, que acabam sendo criticadas por dizerem o que pensam, mas que possuem opinião. Especialmente a este que não está mais presente em sua forma física junto comigo, mas sempre dentro do meu coração, meu já falecido pai Elpídio Antônio Merisio. Meu exemplo, meu norte, meu orgulho, meu amigo. A pessoa que mais acreditou que tudo isso iria acontecer. Um homem íntegro, que impunha sua calma para abrandar os sofrimentos e as angústias de todos. Um ser maravilhoso, que, mesmo depois de falecido, ainda me ensina muita coisa. Saudades de sua “prosa mansa” e dos conselhos na varanda. Tenho certeza que um dia nos encontraremos, diante de Deus, para muitas outras conversas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas constantes bênçãos em minha vida e ser sempre o motivo maior, aos meus pais pela educação que recebi, a minha família pelo apoio, meus professores que acreditaram em mim e deram o incentivo para que eu seguisse nesta estrada da docência, a meu amigo e compadre Bruno Osternack pelo grande apoio logístico, aos colegas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) - campus Toledo, à Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE), ao laboratório do Hospital de Clínicas (HC), ao laboratório da PUCPR – *campus* Curitiba na pessoa da Dra. Ligia Claro, ao Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) nas pessoas da Eli Rosane Sade e José Renato Barbosa, à Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia (APACN), à equipe de enfermagem da hematopediatria, Dra. Mônica Nunes Lima, Dr. Tiago Hessel Tormen, Dra. Débora Silva Carmo, secretárias da hematopediatria Luzia e Eliana. Finalmente a esta pessoa maravilhosa que conheci e tive a oportunidade de aprender muita coisa, principalmente a ver a pesquisa da forma que realmente ela é, Dra Mara Albonei Dudeque Pianovski, minha orientadora.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO TEÓRICA	3
3.1 ANEMIA FALCIFORME.....	3
3.2 PROCESSO DE FALCIZAÇÃO.....	5
3.3 FISIOPATOLOGIA DA ADESÃO VASCULAR E MOLÉCULAS ENVOLVIDAS.....	8
3.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	16
3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS DOENÇAS FALCIFORMES...	17
4. MÉTODOS	19
4.1 ESTUDO, PACIENTES E PARCERIAS.....	19
4.2 DEFINIÇÃO DE CRISE CLÍNICA.....	20
4.3 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO DE DÍMEROS-D	20
4.4 DETERMINAÇÃO DE sICAM-1, sVCAM-1, SELECTINA-E E SELECTINA-P, PELO MÉTODO DE ELISA.....	21
4.4.1 Determinação da concentração sérica de VCAM-1.....	22
4.4.2 Determinação da concentração sérica de ICAM-1.....	23
4.4.3 Determinação da concentração sérica de selectina-P.....	24
4.4.4 Determinação da concentração sérica de selectina-E.....	25
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26

5. RESULTADOS	26 ⁵
5.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA.....	26
5.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS QUANTO À PRESENÇA DE CRISE.....	27
5.3 MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E PRESENÇA OU NÃO DE CRISE.....	28
5.4 MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E GENÓTIPOS DE DOENÇA FALCIFORME.....	29
5.5 MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS.....	30
5.6 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MARCADOR DÍMEROS-D.....	32
5.7 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MARCADOR sICAM-1.....	32
5.8 PROBABILIDADE DAS VARIÁVEIS DE IDENTIFICAR A CRISE CLÍNICA.....	34
6. DISCUSSÃO	38
6.1 NEUTRÓFILOS NA DOENÇA FALCIFORME.....	38
6.2 RETICULÓCITOS NA DOENÇA FALCIFORME.....	40
6.3 CONCENTRAÇÃO DE DÍMEROS-D NA DOENÇA FALCIFORME.....	41
6.4 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE SELECTINAS-P e E.....	44
6.5 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE sICAM-1 e sVCAM-1.....	46
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS	50
9. APÊNDICES	62
9,1 TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO.....	62
9.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APACN	Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia
BCAM/Lu	Molécula Celular de Adesão Basal
CEGEMPAC	Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
2, 3 DPG	2, 3 difosfo-glicerato
FEPE	Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
FvW	Fator de Von Willebrand
FS	Fosfatidilserina
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HC	Hospital de Clínicas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ICAM -1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
LDH	Desidrogenase Láctica
NO	Oxido Nitroso
PCR	Proteína C Reativa
PSGL-1	Molécula de Adesão Leucócito-Plaqueta
PMN	Neutrófilos Polimorfonucleares
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
STM	Trombomodulina Solúvel
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR-1	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TSP	Trombospondina
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1

VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VLA-4	Antígeno de Ativação Tardia

LISTA DE GRAFICOS E FIGURAS

FIGURA 1 – FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME.....	4
FIGURA 2 – RELAÇÃO ENTRE HEMÓLISE, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E VASO-OCCLUSÃO NA ANEMIA FALCIFORME.....	6
FIGURA 3 – MECANISMO DE DESEQUILÍBRIO IÔNICO DA CÉLULA FALCIFORME.....	7
FIGURA 4 – PROCESSO DE VASO-OCCLUSÃO E PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	10
FIGURA 5 – ADESÃO DO NEUTRÓFILO AO ENDOTÉLIO.....	11
FIGURA 6 – MECANISMO DE INFLAMAÇÃO E ADESÃO ENDOTELIAL DA CÉLULA FALCIFORME.....	12
FIGURA 7 – ELETROFORESE EM GEL EM Ph ALCALINO COM MIGRAÇÃO DE AMOSTRAS.....	19
FIGURA 8 – CORRELAÇÃO ENTRE sVCAM-1 (ng/ml) E HEMOGLOBINA (g/dl).....	31
FIGURA 9 – CORRELAÇÃO ENTRE sVCAM-1 E PORCENTAGEM DE RETICULÓCITOS.....	32
GRÁFICO 1 – CURVA ROC PARA DÍMEROS-D.....	33
GRÁFICO 2 – CURVA ROC PARA s-ICAM-1.....	33
GRÁFICO 3 – VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE sICAM-1 EM PACIENTES COM E SEM CRISE.....	34
GRÁFICO 4 - VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE DÍMEROS-D EM PACIENTES COM E SEM CRISE.....	35
GRÁFICO 5 - VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE LEUCÓCITOS EM PACIENTES COM E SEM CRISE.....	36
GRÁFICO 6 - VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM E SEM CRISE.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA, HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA E HEMOGLOBINAS A2 E FETAL EM DIFERENTES DOENÇAS FALCIFORMES.....	18
TABELA 2- VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E PRESENÇA OU NÃO DE CRISE	28
TABELA 3- VALORES MÉDIOS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO E DÍMEROS D EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE CRISE.....	29
TABELA 4- VALORES MÉDIOS DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO QUANTO AO GENÓTIPO DOS PACIENTES.....	30
TABELA 5- CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES ENDOTELIAIS E AS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS.....	31

RESUMO

Pacientes com doença falciforme podem apresentar crises clínicas que prejudicam sua qualidade de vida. Com o intuito de contribuir para o conhecimento da fisiopatologia foi desenvolvido o presente trabalho tendo como objetivo analisar marcadores endoteliais em crianças e adolescentes com doença falciforme. Foram divididos em dois grupos: com crise clínica, caracterizada por dor, com necessidade de hidratação e analgesia potente, e sem crise clínica. Em 43 pacientes, correspondente a 16 momentos em crise clínica e 30 sem crise clínica, foram analisados as moléculas de adesão intercelular-1 solúvel (sICAM-1) e de adesão vascular-1 solúvel (sVCAM-1), selectina-P solúvel, selectina-E solúvel e dímeros-D, além de parâmetros hematológicos como contagem de reticulócitos, hemoglobina fetal, leucometria e contagem de neutrófilos. A idade variou de 12 a 277 meses, 19 apresentavam fenótipo SS, 13 eram SC, 10 S β , e 1 SD. Observou-se que somente a contagem de neutrófilos ($p=0,01$), e as concentrações de sICAM-1 ($p=0,002$) e de dímeros-D ($p=0,027$) apresentaram diferença significativa ao se comparar os dois grupos estudados. A diminuição de sICAM-1 classificou corretamente 71% dos pacientes em crise clínica apresentando sensibilidade de 93% e especificidade de 53% para valores abaixo de 255 ng/ml. Para valores acima de 192 ng/ml, as concentrações de dímeros-D apresentaram sensibilidade de 90% e especificidade de 66%. Todos os pacientes apresentaram concentrações de sVCAM-1 acima dos valores máximos de referência, sem diferença quanto à presença de crise clínica. Entretanto a concentração de sVCAM-1 apresentou correlação negativa com a idade e correlação positiva com a contagem de reticulócitos, sugerindo que um aumento na Hb é um fator protetor para distúrbios de microcirculação e o aumento do percentual de reticulócitos é fator de risco para tais distúrbios. Também a concentração de sVCAM-1 foi a única variável que apresentou diferença entre os fenótipos, sendo maior em indivíduos SS quando comparados com indivíduos SC; a concentração de selectina-E apresentou correlação negativa com a idade dos pacientes. Por análise de regressão logística, as variáveis número de leucócitos ($p<0,001$), número de neutrófilos ($p=0,001$) e concentração de dímeros-D ($p=0,001$), auxiliam a classificar o grupo de pacientes com doença falciforme quanto à apresentação de crises. Individualmente, contudo, sICAM-1, dímeros-D e contagem de neutrófilos não representam bom parâmetro. Os resultados obtidos permitem sugerir que alterações nas concentrações de moléculas de adesão vascular descritas para pacientes adultos já podem ser constatadas em pacientes pediátricos o que suscita o interesse pela

identificação de tratamentos que possam ser utilizados precoce e preventivamente, diminuindo a morbi-mortalidade relacionada às síndromes falciformes.

ABSTRACT

Patients with sickle cell disease may have clinical seizures that impair their life quality. The aim of this study was to analyze endothelial markers in children and adolescents with sickle cell disease in order to contribute to the knowledge of this pathophysiology. The patients were divided into two groups: one with clinical crisis, characterized by pain, in need of hydration e potent analgesia, and another group without clinical crisis. In 43 patients, corresponding to 16 clinical crisis moments and 30 without clinical crisis, soluble intercellular-1 adhesion molecules (sICAM-1) and soluble vascular-1 soluble molecules (sVCAM-1), soluble P-selectine, soluble E-selectine and D-dimers were analyzed, besides, hematological parameters such reticulocytes count, fetal hemoglobin, leucometry and neutrophils count. The age ranged from 12 to 277 months, were 19 shows SS phenotype, 13 were SC, 10 S β and 1 SD. It was observed that only neutrophils count ($p=0,01$), sICAM-1 ($p=0,002$) and D-dimers ($p=0,027$) concentrations showing significant difference when compared to the studied groups. The sICAM-1 decrease classified properly 71 % of the clinical crisis patients, showing 93 % sensibility and 53 % specificity to values below 25 ng/mL To values above 192 ng/mL, the D-dimers concentrations shows 90 % sensibility and 66 % specificity. All patients showed sVCAM-1 concentrations above reference maximum values, with no difference when compared with clinical crisis presence. However, the sVCAM-1 concentration showed negative correlation with the age and positive correlation with reticulocyte count, suggesting that a Hb increase is a protector factor to microcirculation disorders and the reticulocytes percentual increase is a risk factor to such disorders. Also the sVCAM-1 concentration was the only variable that showed difference between the phenotypes, being higher in SS individuals when compared with SC individuals; the selectine-E concentration showed negative correlation with the patients age. By logistic regression analysis, variables such leucocytes number ($p<0,001$), neutrophils number ($p=0,001$) and D-dimers concentration ($p=0,001$) helps to

classified the group patients with sickle cell disease about the crisis presentation. Individually, however, sICAM-1, D-dimers and neutrophils count doesn't represent a good parameter. The results allows to suggest that alterations on vascular adhesion molecules concentration describes to adults patients can be found in pediatric patients, which raises the interest for the identification for treatments which can be used in a precocious e preventive way, decreasing the morbid-mortality related to sickle cell disease

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é considerada problema de saúde pública, devido sua alta prevalência e morbidade. É a primeira doença humana monogênica caracterizada em nível molecular, tendo como base a substituição de ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia beta da globina (HIGGS; WOOD, 2008). Estas moléculas modificadas, em baixas tensões de oxigênio, são polimerizadas, levando à deformação do eritrócito, o que produz aumento da rigidez de sua membrana, trazendo como consequência anemia hemolítica crônica e oclusão de pequenos vasos sanguíneos com danos teciduais isquêmicos (TITUS *et al*, 2004). Clinicamente, manifesta-se por crises dolorosas, que muitas vezes aparecem associadas com síndrome torácica aguda, além de acidente vascular cerebral ou infecções, e são a principal causa de hospitalização destes pacientes (SUTTON *et al*, 1999). A qualidade de vida da criança e do adolescente com doença falciforme é prejudicada principalmente pelos fenômenos vasoclusivos, que geram as crises de dor.

Fatores como o genótipo da doença, fatores bioquímicos que podem influenciar no processo de polimerização da HbS, no fenômeno de falcização e na hemólise, e fatores ambientais como o local onde vive o paciente, prevalência de doenças infecto-contagiosas, condições socioeconômicas e acesso à assistência médica traçam o perfil de manifestação e evolução das doenças falciformes (ZAGO, 2007).

A frequência e a intensidade das crises de dor variam muito entre os pacientes. O número de crises por ano tem sido usado como medida de gravidade clínica da doença, e tem demonstrado correlação com a morte

Maior morbidade está associada a baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF); a introdução do uso de hidroxiuréia, há cerca de 25 anos, como tratamento, com a finalidade de aumentar essa concentração, tem conseguido diminuir a frequência dos episódios vasoclusivos, nessa população (CHARACHE S *et al.*, 1992). Resultados do seu uso, em crianças de baixa idade, ou seja, a

partir de 9 meses, foram publicados recentemente, demonstrando a eficácia e segurança de seu emprego terapêutico (THORNBURG *et al*, 2012).

No entanto, ainda persiste a preocupação com a lesão vascular crônica, que a falcização das hemácias provoca em nível endotelial. Entre os elementos que participam dessa lesão, estão as proteínas plasmáticas e as de superfície celular, como fator de von Willebrand (FvW), trombospondina (TSP), fibrinogênio e fibronectina, laminina, glicoproteína Ib, integrinas, molécula de adesão celular vascular 1 solúvel (sVCAM-1), receptor Fc, TNF- α , selectina-E, selectina-P, molécula de adesão intercelular 1 solúvel (sICAM-1), entre outras (NAOUM, NAOUM, 2004; MONTES *et al*, 2002). Um aspecto interessante é que concentrações maiores de sICAM-1, sVCAM-1, selectina-P, selectina-E, são observados em pacientes com doença falciforme comparados com os de pacientes sem esta doença (KANAVAKI *et al*, 2012; GLADWIN *et al*, 2003; DUIITS *et al*, 1996); tais moléculas são amplamente estudadas em estados de vasoclusão e ativação endotelial, trazendo informações importantes em outros quadros clínicos que têm como base estes eventos. Raros são os estudos em crianças.

No presente trabalho há o intuito de se avaliar as concentrações séricas dos marcadores selectina-E, selectina-P, sICAM, sVCAM e dímeros-D, em crianças e adolescentes com doença falciforme, em períodos de intercorrências clínicas e compará-las com as de pacientes com doença falciforme em estado clínico basal, com a finalidade de esclarecer se tais marcadores podem auxiliar no acompanhamento clínico desses pacientes e contribuir para a compreensão da fisiopatologia da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar laboratorialmente pacientes com doenças falciformes em crise clínica pela análise e correlação de marcadores endoteliais e exames de rotina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar as concentrações séricas das selectinas-E e P, das proteínas de adesão sICAM-1 e sVCAM-1, bem como de dímeros-D em pacientes com doença falciforme com crise clínica e sem crise clínica, e verificar se há diferença estatística.
- 2) Correlacionar as concentrações séricas das selectinas-E e P, das proteínas de adesão sICAM-1 e sVCAM-1 e das concentrações plasmáticas de dímeros-D com a contagem de leucócitos, neutrófilos, HbF, reticulócitos.
- 3) Verificar se há diferença estatística dos marcadores endoteliais quanto aos genótipos das doenças falciformes e quanto à idade dos pacientes.

3. REVISÃO TEÓRICA

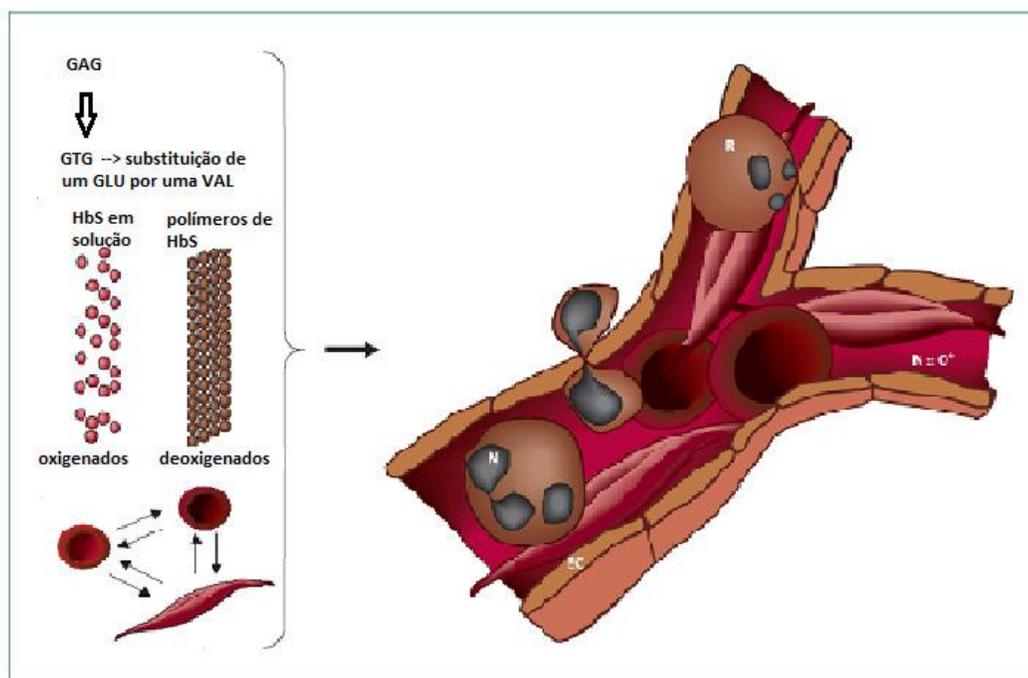
3.1 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme foi descrita pela primeira vez, no início do século XX, por Herrick (1910), que relatou um estudante indiano com anemia grave cujas células sanguíneas possuíam um formato alongado. Por anemia grave, entende-se a concentração sérica de hemoglobina abaixo de 7,0 g/dl (WHO, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a anemia falciforme é a doença monogênica mais comum no Brasil, com prevalência estimada em cerca de 8 mil

casos da doença no país (OPA/OMS, 1998). No Paraná, segundo WATANABE et al. (2008), a prevalência da anemia falciforme é de 2,2/100.000 recém-nascidos, menor do que na região centro-oeste, norte e nordeste do país.

O advento da biologia molecular permitiu desvendar a natureza genética da anemia falciforme. A substituição da base nitrogenada timina por adenina, no cromossomo 11, no sexto resíduo de aminoácido da cadeia β da hemoglobina, resulta na síntese de valina ao invés de ácido glutâmico; como consequência, forma-se a hemoglobina S (HbS). Em condições de desoxigenação, esta hemoglobina forma polímeros que condicionam a mudança de forma da hemácia, de disco bicôncavo para forma de foice, propiciando a oclusão vascular na microcirculação (FIGURA1).

FIGURA 1 – FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME



Fonte: STUART; NAGEL (2004)

Nota: a substituição de adenina por timina, leva à síntese de valina ao invés de ácido glutâmico, resultando na formação de HbS. Em situação de desoxigenação, formam-se polímeros de HbS, que alteram a forma da hemácia, favorecendo obstrução vascular ao nível da microcirculação.

Além disso, essas hemácias apresentam menor tempo de vida, devido à destruição acelerada, o que faz com que os pacientes apresentem anemia e alterações ósseas decorrentes da hiperproliferação medular.

Existe grande variabilidade clínica, desde formas leves, quase assintomáticas, a formas incapacitantes ou com alta taxa de mortalidade. As variações das condições climáticas, sociais, econômicas e de cuidados médicos contribuem para esta diversidade, mas não explicam todo o seu contexto (NAGEL *et al*, 1985).

Esta doença teve base molecular com origem multicêntrica, a partir da detecção de duas mutações distintas para a HbS. Ambas apresentavam a mesma troca de aminoácidos, mas diferiam em seqüências de DNA em outros pontos (KAN, DOZY, 1978). Os haplótipos foram definidos como: República Centro Africana, Benin e Senegal (PAGNIER *et al*, 1984), e ainda outros haplótipos independentes descritos em populações provenientes da Península Arábica e da Índia (KULOZIK *et al*, 1986).

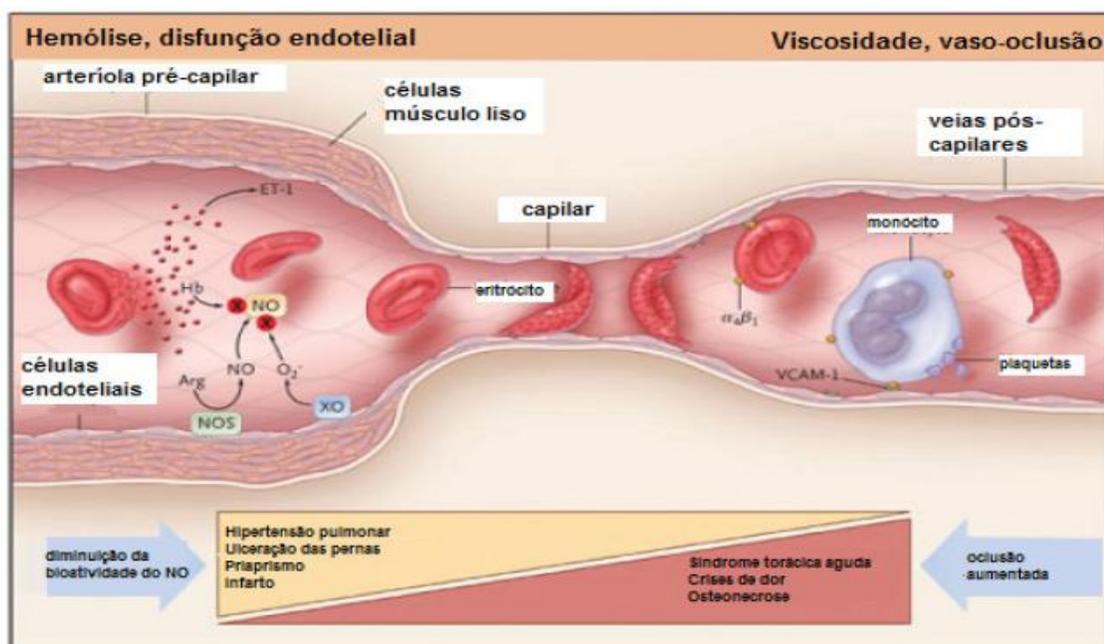
Segundo NETO e PITOMBEIRA, 2003, a definição desses haplótipos pode auxiliar na detecção de eventos epistáticos que contribuam para o estudo da evolução da raça humana, mas também para a compreensão da heterogeneidade clínica, fornecendo prognóstico adequado aos diferentes pacientes.

3.2 PROCESSO DE FALCIZAÇÃO

A condição básica da fisiopatologia da anemia falciforme é a ocorrência de episódios vasoclusivos, secundários à alteração de forma da hemácia, pela polimerização da Hb S (Figura 2). Entretanto outros eventos se associam prolongando o tempo de trânsito dos eritrócitos afetados em condições microcirculatórias desfavoráveis (STUART; NAGEL, 2004). A vasoclusão é regida por alguns mecanismos centrais, entre eles o aumento da adesão celular dos elementos sanguíneos ao endotélio, distúrbios na coagulação e alteração na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (ASLAN; FREEMAN, 2007).

Na ausência de oxigênio, a HbS expõe compostos carbonados da valina substituída, que interagem com componentes da fenilalanina, da posição B85, e também com a leucina da posição 88 da mesma globina. A interação ($b85 \leftrightarrow b6 \leftrightarrow b88$) dá início à agregação das moléculas. Os polímeros passam então da forma solúvel para a forma insolúvel, o que altera a viscosidade intracelular e induz a formação de cristais de HbS (PERUTZ, 1972). Essa polimerização é dependente de pH, concentração de 2,3-DPG, temperatura, concentração de HbS e interação com outras hemoglobinas. O oxigênio molecular (O_2) tem fundamental importância na formação dos agregados, visto que a HbS só polimeriza na ausência deste gás (PLATT, 1992). Para que ocorra a agregação das moléculas de HbS é necessário, além da desoxigenação, que estejam em alta concentração intracelular (ZAGO, PINTO, 2007).

FIGURA 2 – RELAÇÃO ENTRE HEMÓLISE, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E VASOCLUSÃO NA ANEMIA FALCIFORME

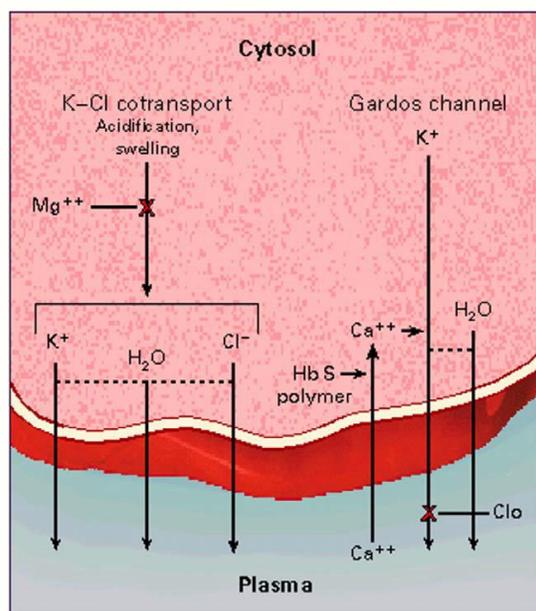


Fonte: GLADWIN & VICHINSKY, (2008) Nota: A figura ilustra hemólise intravascular e sequestro de NO pela hemoglobina extracelular, contribuindo para relativa deficiência de NO, vasoconstrição e ativação endotelial; rigidez do eritrócito conseqüente à polimerização da HbS, resultando em oclusão vascular; e adesão de reticulócitos falciformes, leucócitos e plaquetas ativadas ao endotélio das veias pós-capilares

A hemoglobina F (HbF) não se incorpora nesse agregado, por não apresentar cadeia beta, sendo assim, exerce o papel de diminuir o efeito polimerizante da HbS. Uma constatação desse conceito é observada na situação de associação de HbS com persistência hereditária de HbF, onde o processo de falcização é menos intenso do que na anemia falciforme (GILMAN, HUISMAN, 1985). Além disso, os sintomas resultantes da oclusão vascular são vistos com maior freqüência após os 6 meses de idade. Até então, as crianças tendem a ser assintomáticas devido a maior concentração celular de HbF (SERJEANT, 1999).

Outro fator predisponente à vasocclusão é a redução na deformabilidade das hemácias falciformes, secundária a lesões de membrana. Essa célula apresenta falência parcial da bomba sódio/potássio/ATPase (FIGURA 3), ficando impossibilitada de manter o gradiente eletroquímico, resultando na perda de potássio e ganho de sódio. A saída de cloretos e potássio da célula facilita a formação de polímeros, que causam lesões no citoesqueleto celular, promovendo a rigidez da membrana eritrocitária. O tempo necessário para que o processo de falcização cause distorção celular é de aproximadamente treze minutos. Portanto

FIGURA 3 - MECANISMO DE DESEQUILÍBRIO IÔNICO DA CÉLULA FALCIFORME



Fonte: BUNN (1997)

em áreas de estagnação do sangue a vulnerabilidade à falcização é maior (FRENETTE, ATWEH, 2007; GIBSON, ELLORY, 2002; BRUGNARA, 2003).

As células falcizadas possuem maior capacidade de adesão ao endotélio, a partir do que, circulando com dificuldade, contribuem para o atraso do fluxo sanguíneo e para a falcização de mais hemácias amplificando o mecanismo de doença vascular e de episódios trombóticos. Além das variáveis celulares, fatores plasmáticos podem aumentar a adesão das células falciformes (HEBBEL, 1997; SERJEANT, 1999), como será descrito a seguir.

3.3 FISIOPATOLOGIA DA ADESÃO VASCULAR E MOLÉCULAS ENVOLVIDAS

No contexto das crises e do processo de falcização, destacam-se a ativação endotelial e o envolvimento de marcadores de disfunção endotelial, ativação e inflamação (FRENETTE, 2002; BELCHER *et al*, 2000; HEBBEL, 1997; DUIJS *et al*, 1996).

Em condições normais, a aderência dos eritrócitos ao endotélio é insignificante, entretanto, quando condições patológicas são associadas com condições de baixo fluxo sanguíneo, como nas hemoglobinopatias, as propriedades reológicas dos eritrócitos se alteram, apresentando um risco circulatório importante (YEDGAR *et al*, 2002).

Quanto maior for a densidade da célula, maior é a sua aderência ao endotélio. As células falciformes se aderem às células endoteliais por meio de antígenos de superfície. As células endoteliais ativadas atraem as plaquetas ao local de ativação e facilitam a marginalização dos leucócitos e sua adesão ao endotélio, contribuindo de vários modos para a oclusão vascular (YEDGAR *et al*, 2002). Proteínas plasmáticas como fator de von Willebrand (FvW), trombospondina (TSP), fibrinogênio e fibronectina são intermediários da interação celular com moléculas das células endoteliais, como laminina, glicoproteína Ib,

integrinas, molécula de adesão celular vascular 1 solúvel (sVCAM-1), receptor Fc, TNF- α (NAOUM; NAOUM, 2004; MONTES *et al*, 2002).

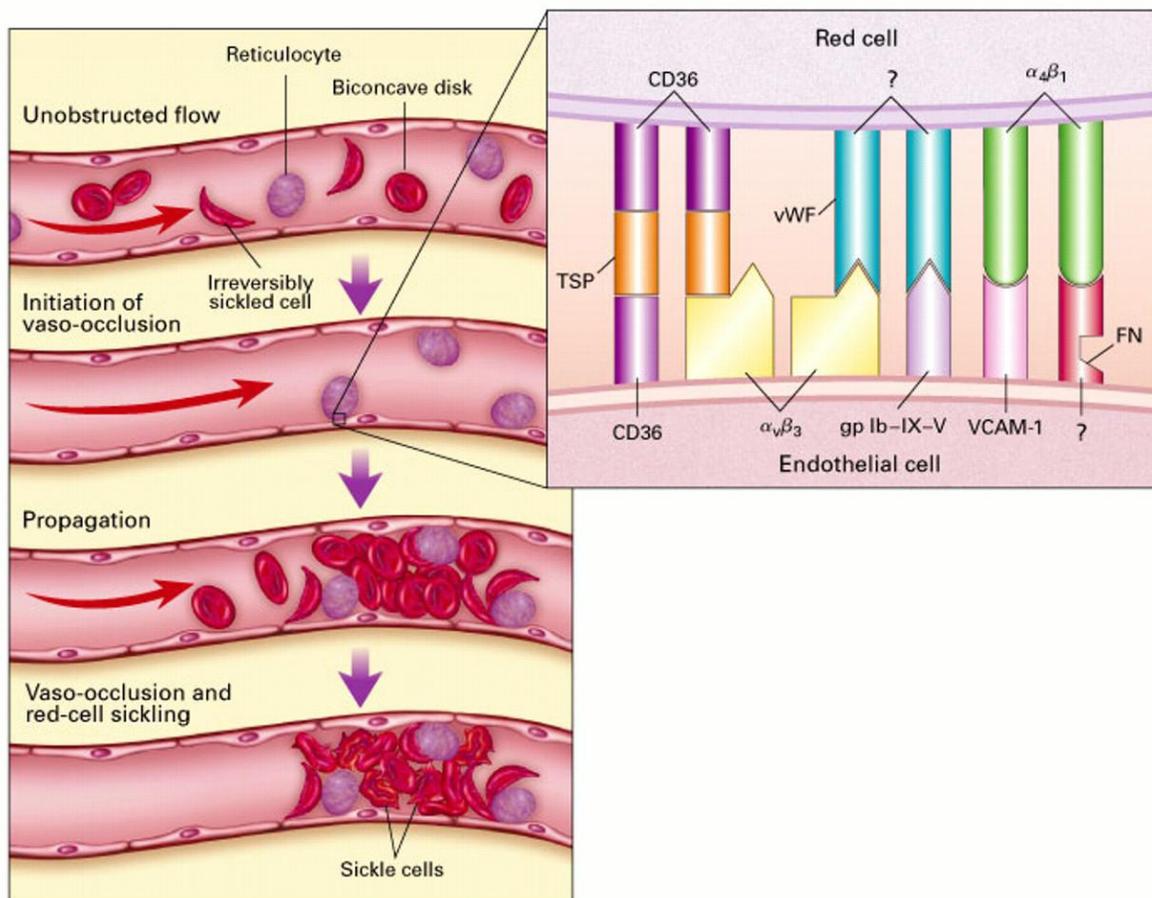
A formação de polímeros de Hb S dentro dos eritrócitos tem como consequência múltiplas alterações da célula, entre elas a exposição de moléculas da membrana celular como fosfatidilseína (FS), CD36, CD47, CD49d e molécula celular de adesão basal (BCAM/Lu) (TELEN, 2000). Deste modo a membrana reflete alterações intracelulares. Essas modificações têm consequências que as amplificam, levando às manifestações clínicas decorrentes de eventos gerados como o aumento da adesão de hemácias ao endotélio, o que desencadeia fenômenos inflamatórios que influenciam também os granulócitos e as plaquetas, o enrijecimento da membrana, encurtando a sobrevivência dos eritrócitos na circulação, favorecendo a anemia hemolítica, as lesões microvasculares, a depleção de NO que contribui para vasoconstrição, ativação da inflamação e da coagulação (ZAGO; PINTO, 2007).

As células endoteliais, por sua vez, produzem NO que é vasodilatador, endotelina-1, que possui ação vasoconstritora potente, e agentes pró-inflamatórios, que aumentam as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis e estimulam monócitos a secretarem citocinas inflamatórias. Estas, por sua vez, estimulam as plaquetas, desencadeando a cascata de coagulação (GRAIDO-GONZALEZ *et al*, 1998).

O processo vasoclusivo na anemia falciforme é, então, iniciado pelas interações anormais entre os eritrócitos e o endotélio, de tal forma que a gravidade clínica da doença está associada diretamente à adesão eritrocitária (ASLAN; FREEMAN 2007).

O CD36 é uma glicoproteína que tem atividade de receptor para várias proteínas da matriz extracelular, como a TSP, que intermedeia a interação da células com o endotélio (FIGURA 4) (TELEN, 2000; ZAGO &PINTO, 2007).

FIGURA 4 - PROCESSO DE VASOCLUSÃO E PARTICIPAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO



Fonte: HEBBEL, (2000)

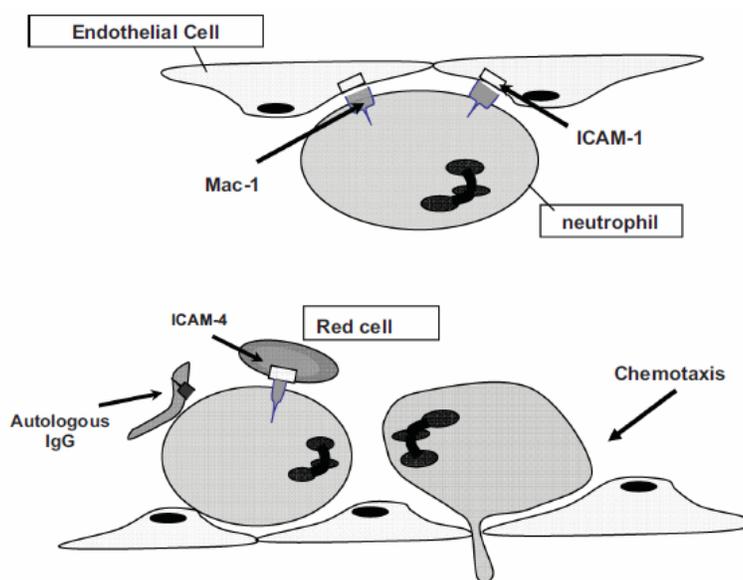
O CD49d é um componente do antígeno de ativação tardia (VLA-4), que promove a interação da célula com VCAM-1 expresso no endotélio, ou ainda via fibronectina, expressa na matriz (ZAGO & PINTO, 2007). O aumento da adesão de hemácias de pacientes com anemia falciforme é relacionado com a exposição do VLA-4, que se liga à VCAM-1 (WAUTIER & WAUTIER, 2011). Segundo os mesmos autores, qualquer estado de hipoventilação ou infecção, acarreta, nestes

pacientes, maior risco de hipóxia local ou sistêmica que precipita ou contribui para a vasclusão tecidual através do aumento da polimerização da HbS. A hipóxia também induz aumento da liberação de VCAM-1, com consequente adesão das hemácias ao endotélio vascular.

A ativação dos neutrófilos faz com que estes expressem CD64, integrinas, CD36, selectinas-L, e molécula de adesão leucócito-plaquetas (PSGL-1), favorecendo a adesão endotelial (FIGURA 5) além de recrutar plaquetas e outros neutrófilos e também causam a lesão do endotélio pela secreção de peróxidos (OKPALA, 2004).

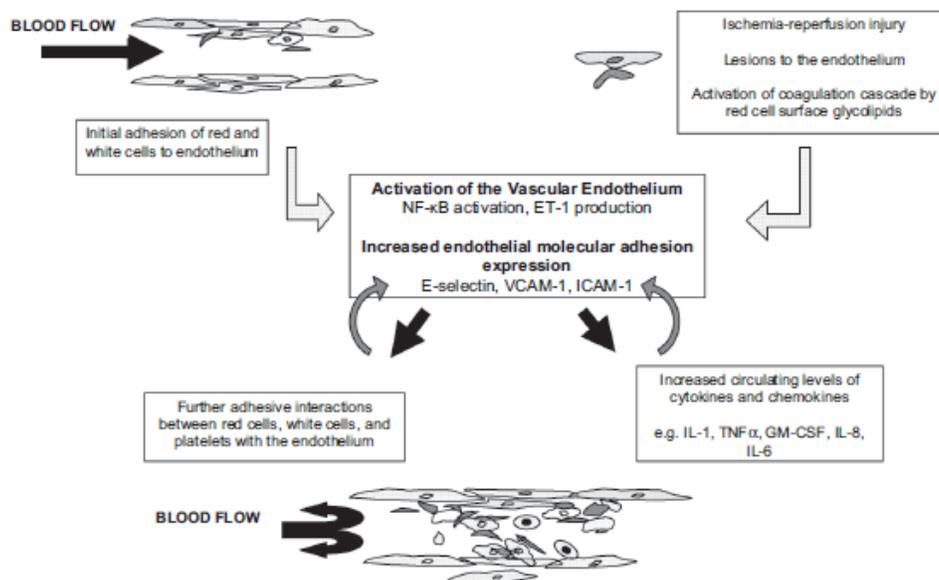
As plaquetas ativadas nos portadores de doenças falciformes expressão CD62p (selectina-P), que favorece a ligação com o endotélio e com neutrófilos, via CD61 e PSGL-1 (ZAGO, PINTO, 2007). A ativação das células endoteliais faz com que estas expressem VCAM-1 e ICAM-1, que facilitam a adesão de células sanguíneas ao endotélio, conforme mostra a figura 6 (SOLOVEY, 2001).

FIGURA 5 - ADESÃO DO NEUTRÓFILO AO ENDOTÉLIO



Fonte: CONRAN *et al*, (2009)

FIGURA 6 - MECANISMO DE INFLAMAÇÃO E ADESÃO ENDOTELIAL DA CÉLULA FALCIFORME



Fonte: CONRAN *et al*, (2009)

Estudos revelam que pacientes com doença falciforme apresentam concentrações elevadas de sICAM-1, sVCAM-1, selectina-P, selectina-E, trombomodulina solúvel e proteína C reativa (PCR) em comparação com controles normais (KANAVAKI *et al*, 2012).

GLADWIN *et al*, (2003); DUITTS *et al*, (1996), demonstraram que as concentrações séricas de sCD40L, selectina-E, VCAM-1 e ICAM-1 aproximadamente duplicam para os pacientes com anemia falciforme, em comparação com controles sem esta anemia.

A família das selectinas é composta por três membros: selectina-L, selectina-P e selectina-E, sendo esta última a única encontrada apenas no

endotélio. Esta especificidade proporciona uma oportunidade para o estudo de aspectos fisiopatológicos do endotélio na doença cardiovascular e inflamatória. As selectina-P e E são expressas na superfície do endotélio quando estimulado por algumas citocinas inflamatórias (IL-1, IL-10 e TNF- α). A selectina-P pode ser também encontrada na superfície de plaquetas ativadas, e quando expressa, promove a adesão do leucócito ao endotélio (JOANNIDES, BELLIEN, THUILLEZ, 2006).

A selectina-P foi encontrada em maior concentração sérica em pacientes com câncer de mama (GLADWIN, SCHECHTER, OGNIBENE, 2003). Sabe-se que esta molécula promove a adesão de células tumorais circulantes intermediando a disseminação tumoral por via hematogênica, enquanto a interação dessas células com a selectina-P expressa em plaquetas ativadas, supre o tumor com fatores de crescimento e substâncias mitogênicas (BLUM *et al*, 2005). Esta molécula é também encontrada em concentrações elevadas em situações como diabetes, hipertensão arterial, tabagismo e hipercolesterolemia e parece ser capaz de predizer a ocorrência de um evento cardiovascular adverso (MONTES *et al*, 2002).

Galen, (2002), salienta que o aumento da concentração sérica da selectina-E, observado na hipertensão arterial, possa refletir a disfunção endotelial, mas não necessariamente predizer o desenvolvimento de lesão de órgão alvo, pois, diferentemente do FvW, a selectina-E está mais relacionada com a regeneração do endotélio após o dano tissular provocado pela progressão da doença. Apesar das controvérsias, pode-se dizer que, em pacientes sofrendo um evento cardiovascular agudo, a concentração de selectina-E freqüentemente se encontra aumentada, quando comparada com controles pareados por sexo e idade (ROLDAN *et al*, 2003).

O aumento da concentração de sVCAM-1 é esperado em pacientes com anemia falciforme, com maiores concentrações ainda durante crises vasclusivas (MONTES *et al*, 2002). DWORKIS *et al*, (2011) relatam que não só a concentração sérica de VCAM-1, mas também as de TNF- α e TNF-R1 são

significativamente mais elevadas em indivíduos com anemia falciforme grave, ou seja, com múltiplas e constantes intercorrências clínicas.

O zinco parece exercer um papel importante na expressão de VCAM-1 em pacientes com anemia falciforme, pois parece modular a adesão celular através da VCAM, o que faz pensar que terapêutica com zinco poderia melhorar o estado destes pacientes (KUVIBIDILA *et al*, 2006).

A ICAM-1, proteína produzida pela célula endotelial, promove a interação destas células com a matriz extracelular e desempenha um papel importante no recrutamento e na retenção de células pró-inflamatórias. Sua produção é induzida por citocinas. Está envolvida no processo inicial da inflamação e se mantém presente na progressão da sinovite reumatóide (KLIMIUK *et al*, 2002). Além disso, a ICAM-1 também está envolvida nas interações célula-célula na resposta imune, e é o maior receptor de rinovirus humano. A expressão de ICAM-1 aumentada reflete um estado de endotélio ativado que pode colaborar com a adesão leucocitária e exacerbar eventos vasculares oclusivos (SHIU *et al*, 2000). Embora o papel fisiológico dessa molécula de adesão celular ainda não esteja totalmente elucidado, já foi publicado que pacientes com anemia falciforme tem elevadas concentrações de sICAM-1 no plasma (PARHAM, 2001).

O VEGF induz a expressão de ICAM-1 e foi encontrado aumentado no plasma dos pacientes com anemia falciforme sem crises ou intercorrências (LU, PEREZ, MA, 1999).

Estudos em pacientes com hipertensão arterial sistêmica demonstram aumento na concentração plasmática de ICAM, VCAM e selectina-E e sugere-se que a avaliação das moléculas de adesão possa ser útil na avaliação de processos aterogênicos iniciais (SANTELLO, RODRIGUES, 1998).

Outro marcador que tem merecido atenção no estudo da doença falciforme são os dímeros-D, que nada mais é do que o produto de degradação da fibrina gerado durante a fibrinólise. A concentração sérica deste marcador se eleva comprovadamente em pacientes com trombose venosa profunda aguda (KEARON *et al*, 1998).

Em episódios vasoclusivos, a geração de trombina é acoplada ao aumento da atividade fibrinolítica levando a um aumento na concentração de dímeros-D e do complexo plasmina anti-plasmina. A ativação endotelial mediada por processos lesivos desencadeia a via extrínseca da coagulação, além de aumentar os níveis de marcadores de lesão endotelial (JOHN *et al*, 2009). A concentração sérica de dímeros-D é aumentada em crise aguda da doença falciforme, e pode ser utilizada como marcador de complicações relacionadas com doença falciforme (NSIRI *et al*, 1996; TOMER *et al*, 2001; HAGGER *et al*, 1995; ATAGA, 2009).

Segundo JAVEED *et al*, (2010), a dosagem plasmática de dímeros-D apresenta um valor significativamente aumentado em pacientes com anemia falciforme que apresentam síndrome torácica aguda, por outro lado, pacientes sem intercorrências apresentam uma concentração plasmática menor, apesar de ser maior do que os valores de referência em alguns casos.

O FvW é uma glicoproteína sintetizada pelo endotélio responsável pela mediação entre a adesão plaquetária ao subendotélio durante o processo de hemostasia primária. O aumento da concentração sérica de FvW é associado com maior risco de eventos clínicos da doença cardiovascular, principalmente tromboembolismo, infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (BLANN, 2006).

Concentrações elevadas de FvW foram também descritas em alguns tipos de cânceres, como os de cabeça e pescoço, próstata e mama (ROHSIG *et al*, 2001).

O CD47 é um receptor relacionado ao fator Rh, e atua como receptor da TSP, que liga o eritrócito ao endotélio via receptor da vitronectina, e facilita o processo de quimiotaxia de leucócitos (ZAGO, PINTO, 2007).

A BCAM/Lu é responsável pela interação célula-célula e célula-matriz, sendo que a interação do BCAM/Lu via laminina é um dos fenômenos de adesão mais bem caracterizados na anemia falciforme (TELEN, 2000).

A FS é esperada em maior concentração na parte interna da membrana do eritrócito, mas em algumas células falcêmicas ela acaba sendo encontrada em

maior quantidade na parte externa da célula. A exposição desta molécula aumenta cerca de três vezes o potencial de adesão celular, além do que, algumas correlações são feitas com a exposição de FS e a geração de trombina, confirmando a importância da exposição de FS como um dos principais determinantes da aderência vascular e da ativação da coagulação (HEBBEL, 1997).

Em resumo, a coagulação crônica e a ativação endotelial, que ocorrem na anemia falciforme, resultam em um estado de hipercoagulabilidade. Embora este estado seja considerado multifatorial, está cada vez mais claro que a hemólise crônica desempenha um papel fundamental neste processo. Além disso, em outras doenças caracterizadas por hemólise crônica, como hemoglobinúria paroxística noturna e a talassemia, o processo hemolítico tem sido relacionado com a coagulação e a ativação de complicações trombóticas (ATAGA, ORRINGER, 2003; ELDOR, RACHMILEWITZ, 2002).

3.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo de falcização dos eritrócitos com exposição de fosfatidilserina na membrana parece ser o fator inicial do processo vasoclusivo. Os neutrófilos também aderem ao endotélio, tornam-se mais rígidos e se unem às células falciformes. Este processo tem a participação efetiva do monócito, que secreta vários fatores da inflamação. (McINTYRE, PRESCOTT, ZIMMERMAN, 2003; BALLAS, MOHANDAS, 2004; DAMPIER *et al*, 2004; OKPALA, 2004).

A célula endotelial ativada produz endotelina-1, que apresenta ação pró-inflamatória e vaso-constritora. Em quadros inflamatórios a concentração plasmática de endotelina-1 encontra-se elevada. Este peptídeo ainda aumenta as concentrações de ICAM-1 e VCAM-1 solúveis, e estimula monócitos a secretar citocinas inflamatórias. As plaquetas, estimuladas por estas citocinas, liberam multímeros de vW, que favorecem a ligação entre plaquetas, eritrócitos falcêmicos e o endotélio (GRAIDO-GONZALES *et al*, 1998). Também ocorre a liberação de TSP e fibronectina pelas plaquetas ativadas, que são ligantes entre células e

endotélio. Os neutrófilos são recrutados para o sítio inflamatório, estimulam a produção de peróxidos e expõem maior quantidade de moléculas de adesão, facilitando também a sua adesão ao endotélio contribuindo para o processo de adesão vascular, culminando em eventos vasocclusivos (McINTYRE, PRESCOTT, ZIMMERMAN, 2003).

Neste contexto, ativa-se a cascata inflamatória, e o principal componente do sistema imune inato é o neutrófilo, célula que atua como a primeira a responder à infecção. No caso de uma resposta inflamatória aguda, os neutrófilos migram a partir dos vasos sanguíneos para o local da infecção dentro de minutos (SCHMIDT *et al*, 2011), migração esta mediada por componentes químicos, mecânicos e processos moleculares (SEELY, PASCUAL, CHRISTOU 2003; LEY *et al*, 2007). O processo começa com a captura inicial de neutrófilos a partir do fluxo sanguíneo livre para a célula endotelial de superfície, mediada pelas selectinas que realizam a interação de superfície em determinados tipos de células. Segue-se a atuação de neutrófilos, cuja interação célula-célula é regulada pelas integrinas, moléculas de adesão expressas pelos neutrófilos, que se ligam a moléculas de adesão à superfície, incluindo a sICAM-1 e sVCAM-1, expressas em células endoteliais (GONZALEZ-SIMON, ENIOLA-ADEFESO, 2012).

3.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS DOENÇAS FALCIFORMES

O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme é feito mediante eletroforese de hemoglobinas. As cadeias β globínicas são detectáveis em fase precoce da vida fetal, a partir da 10^a a 12^a semanas de gravidez, o que possibilita o diagnóstico pré-natal da anemia falciforme (SERJEANT, 1999). A aplicação da eletroforese como exame diagnóstico foi consequência de um estudo clássico realizado por Pauling *et al*, (1949), que observaram a diferença de velocidade de migração da hemoglobina dos indivíduos com anemia falciforme, devida a carga elétrica diferente, ou seja, carregada mais positivamente, migrando mais lentamente que a hemoglobina normal.

Ao hemograma, as doenças falciformes apresentam anemia que pode ser moderada até severa, sendo normocítica e normocrômica na maioria dos casos com exceção da associação de HbS com talassemias, o que traz uma microcitose e uma hipocromia ao hemograma. A variação da hemoglobina, do HCM e das hemoglobinas Fetal e A2 estão apresentadas na tabela 1. anisocitose é esperada com valores de RDW maiores que 19,5. Na hematoscopia observa-se a presença de drepanócitos, que são característicos em pacientes portadores de HbS, eliptócitos, células em alvo, policromatofilia devido ao processo hemolítico, esferócitos e eritroblastos. Também podem ser vistos corpúsculo de Howell-Jolly, pontilhado basófilo e esquizócitos. Como consequência da hemólise, ocorre reticulocitose. A leucometria, em geral, é maior, com ou sem desvio nuclear à esquerda. Se espera um aumento no número de plaquetas devido à atrofia do baço e lesão vascular. Ocorre aumento da concentração sérica de lactato desidrogenase (LDH) (OLIVEIRA, 2007).

TABELA 1: VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA, HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA E HEMOGLOBINAS A2 E FETAL EM DIFERENTES DOENÇAS FALCIFORMES.

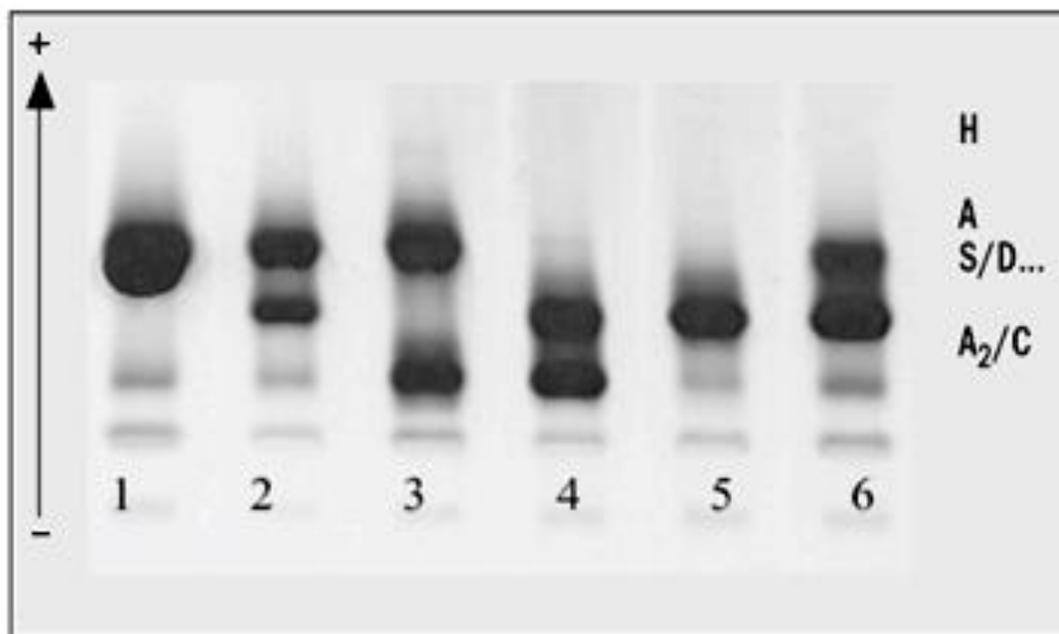
	SS 92 casos	S/ β^0 -tal 32 casos	S/ β^+ -tal 6 casos	SC 26 casos
Hb (g/dl)	7,7 \pm 1,5	8,0 \pm 1,7	10,0 \pm 0,7	11,0 \pm 1,5
HCM (pg)	30,2 \pm 4,1	22,9 \pm 2,5	21,5 \pm 2,3	29,1 \pm 3,2
HbA ₂ (%)	2,5 \pm 0,4	4,3 \pm 1,0	4,3 \pm 0,8	-
HbF (%)	7,4 \pm 6,7	11,6 \pm 7,3	9,8 \pm 8,6	2,8 \pm 2,8

Fonte: ZAGO; PINTO, (2007)

O teste de falcização é positivo em todos os casos de doença falciforme, inclusive nos casos de portadores assintomáticos como o traço falciforme, entretanto o diagnóstico definitivo é feito pela eletroforese em pH alcalino e em pH ácido. Uma única mancha na posição da HbS e uma certa elevação na HbF é

confirmatório de anemia falciforme (SS), e as demais associações exibem padrões diferenciais e característicos na eletroforese, como mostra a figura 7..

FIGURA 7: ELETROFORESE EM GEL EM pH ALCALINO COM MIGRAÇÃO DE AMOSTRAS



Fonte: ZAMARO *et al*, (2002)

Nota: 1. HbAA; 2. HbAS/D; 3. HbAC; 4.HbSC; 5. HbSS; 6. HbS/ β^+ Talassemia

4. MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO, PACIENTES E PARCERIAS

Estudo prospectivo, incluindo 46 pacientes com doença falciforme (genótipos SS,SC,S β ou SD), com idade até 21 anos, sexo masculino e feminino, atendidos no serviço de hematologia pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (anexo 9.1).

Os pacientes foram convidados a participar do projeto, mediante seus responsáveis, que receberam explicações sobre os procedimentos a serem realizados, por fim assinando o termo de consentimento informado (anexo 9.2). A coleta dos exames foi realizada aproveitando-se a mesma punção venosa utilizada para a realização dos exames de rotina, que segue o protocolo para atendimento de pacientes portadores de doenças falciformes, baseado nas orientações do *Southern California Comprehensive Sickle Cell Center*. (<https://scinfo.org/the-management-of-sickle-cell-disease-4th-ed/health-maintenance-chapter>).

O trabalho contou com patrocínio da Fundação Araucária para o desenvolvimento de pesquisa no Paraná, do laboratório do Hospital de Clínicas, do CEGEMPAC, da APACN (Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia) e da FEPE.

4.2 DEFINIÇÃO DE CRISE CLÍNICA

O termo crise clínica em doença falciforme, definido por Diggs (1965), como “qualquer síndrome que se desenvolva rapidamente em pacientes com doença falciforme, devido a alterações hereditárias”, foi utilizado no presente trabalho para os pacientes que apresentaram dor, não controlada com as medidas habituais de ingestão hídrica aumentada e analgésicos comuns (paracetamol/dipirona e codeína), necessitando recorrer ao hospital para garantia de hidratação por via endovenosa e uso de opióides fortes.

4.3 VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO DE DÍMEROS-D

Os resultados dos exames de rotina foram obtidos diretamente das pastas dos pacientes da hematopediatria do Hospital de Clínicas, sendo que a triagem neonatal foi realizada através da eletroforese por focalização isoelétrica, realizada

no laboratório da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE). O hemograma, contagem de reticulócitos, determinação da porcentagem de hemoglobina fetal, da concentração plasmática de dímeros-D e eletroforese de hemoglobina foram realizados no serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas, da UFPR.

A realização de *doppler* transcraniano foi feita no serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

O hemograma foi obtido pelo método automatizado, utilizando-se o contador eletrônico *ADVIA 2120*. A dosagem de hemoglobina fetal foi realizada pelo método de eletroforese por capilaridade, utilizando-se o aparelho *Minicap Protein, Sebia*. A eletroforese de hemoglobina foi realizada por focalização isoelétrica, para os pacientes previamente identificados pelo programa de triagem neonatal da FEPE e confirmada pela eletroforese por capilaridade.

A concentração de dímeros-D foi determinada pela técnica da determinação imunoturbidimétrica de produtos de degradação dos polímeros de fibrina (dímeros-D), com *kit D-Dimer PLUS* da *Dade Behring*, utilizando-se o analisador de coagulação *Sysmex CA-1500*.

4.4 DETERMINAÇÃO DE sICAM-1, sVCAM-1, selectina-E e selectina-P, PELO MÉTODO DE ELISA

As determinações das concentrações séricas de selectinas E e P, ICAM-1 e VCAM-1 foram realizadas no laboratório de pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Prado Velho. O material para esta análise foi coletado no mesmo momento da coleta para exames de rotina, e foi armazenado no Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC).

Os marcadores sVCAM-1, sICAM-1, selectina-E e selectina-P foram determinados pela técnica de ELISA, no laboratório de pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, campus Prado Velho. Para tanto foram utilizados os *kits* de sVCAM-1, sICAM-1, selectina-E e selectina-P da *Invitrogen*, e a leitora de ELISA *Thermo Plate Reader* para leitura das absorvâncias.

4.4.1 Determinação da concentração sérica de VCAM-1

As reações foram realizadas em placas de microtitulação revestidas com anticorpos anti-sVCAM-1. As amostras de soros de pacientes foram diluídas 1:50 com tampão diluente Standard (15mM de azida de sódio). Foram adicionados 100 µL do tampão diluente de padrão de poços correspondente ao zero. Foram pipetados 50 µL de solução de biotilado anti-sVCAM-1 em cada poço, exceto o poço correspondente ao branco. A placa então foi coberta com tampa e incubada durante 2 horas a 37 °C. O líquido então foi desprezado e os poços lavados por 4 vezes com tampão. Em seguida foram adicionados 100 µL de Solução Estreptavidina-HRP de trabalho em cada poço, exceto o poço correspondente ao branco. A placa foi coberta com a tampa e incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente. A solução foi desprezada e os poços lavados por 4 vezes. Foram adicionados 100 µL de cromogénio estabilizado a cada poço, desenvolvendo cor azul. Foi incubado então durante 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Adicionou-se 100 µL de solução de paragem (solução ácido Fosfórico 1M) em cada poço. A solução nos poços deve mudar de cor azul para amarela. A absorvância de cada poço foi lida a 450 nm, contra um branco de cromogénio composto de 100 µL de cada de cromogénio estabilizada e solução de paragem. Os valores obtidos foram intercalados no gráfico para se conseguir a concentração, e os valores, multiplicados por 50, para correção da diluição. Foi realizada, paralelamente ao teste, uma curva de calibração para verificar a linearidade do teste e se as amostras estariam dentro deste limite de linearidade. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante são 394 à 812 ng/ml.

4.4.2 Determinação da concentração sérica de ICAM-1

As amostras de soro foram diluídas na proporção 1:100 com diluente de amostra (tampão proteína de matriz). Determinou-se o número de tiras necessárias para testar as amostras e também para o funcionamento e as normas em branco. Cada amostra, padrão, amostra de controle em branco, e opcionais foram testadas em duplicata, de acordo com o fabricante. As tiras foram lavadas duas vezes com aproximadamente 300 μL de "*Wash Buffer*", com aspiração profunda dos conteúdos dos poços entre lavagens. Foram adicionados 100 μL de diluente de amostra, em duplicata, em todos os poços padrão, deixando os primeiros poços vazios. Foram preparadas diluições padrão por pipetagem de 200 μL de "*sICAM-1 Standard*", duplicado, em poços A1 e A2 (superiores), e transferidos 100 μL de poços B1 e B2, respectivamente. Misturando estes conteúdos, foi transferido mais 100 μL dos poços B1 e B2 para C1 e C2, e assim por diante, até o último par de poços ter 100 μL retirados e desprezados. Foram criadas duas filas de diluições padrão de sICAM-1 variando 0,625-10 ng/mL. A seguir, foram adicionados 100 μL de diluente de amostra, em duplicata aos poços branco. Adicionaram-se 100 μL de cada amostra diluída 1:100, em duplicado, para os poços e os conteúdos foram misturados. Então foram adicionados 50 μL de conjugado HRP diluído a todos os poços, incluindo o poço branco. A placa foi coberta e incubada a temperatura ambiente por 2 horas, sobre uma rotação de 100 rpm. Foi então desprezado o líquido e lavados os poços por 3 vezes com tampão. Então imediatamente foram pipetados 100 μL de solução de substrato TMB em todos os poços, incluindo os poços branco. Foram incubadas as placas à temperatura ambiente cerca de 10 minutos, sob uma rotação de 100 rpm, evitando exposição direta à luz. Foi monitorado o desenvolvimento de cor. A reação foi parada pela adição de 100 μL de solução de parada em cada poço inclusive os poços brancos. Os resultados foram lidos imediatamente a 450 nm. Foi criada uma curva padrão locando a média para cada concentração padrão no eixo das ordenadas contra concentração de sICAM-1 no eixo das abscissas. Determinou-se a concentração de sICAM-1 para cada amostra através da curva. A concentração

foi multiplicada por 100 para correção da diluição 1:100 feita no início. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante estão entre 192,9 e 277,7 ng/ml.

4.4.3 Determinação da concentração sérica de selectina-P

Determinou-se o número de tiras necessárias para testar o número desejado de amostras mais o número apropriado de poços necessários para o funcionamento e as normas em branco. Cada amostra, padrão, amostra de controle em branco, e opcionais foram testadas em duplicata. As tiras foram lavadas 3 vezes com aproximadamente 300 μ L cada vez com tampão de lavagem por poço. Foram adicionados 100 μ L de tampão de ensaio, em duplicado, a todos os poços padrão. Foram adicionados 100 μ L de “sP-selectina Standard” em duplicata aos poços A1 e A2 e misturado, posteriormente transferidos 100 μ L de A1 e A2 para B1 e B2 respectivamente, e assim por diante. Dos últimos poços (G1 e G2), descartados 100 μ L. Foram criadas duas linhas de SP-selectina padrão em diluições que vão de 40-0,63 ng/mL. Foram adicionados 100 μ L de tampão de ensaio, em duplicata para os poços branco, e adicionados 90 μ L de tampão de ensaio em duplicata para os poços de amostra. Foram então adicionados 10 μ L de cada amostra em duplicata às cavidades designadas. Adicionaram-se 50 μ L de anticorpo conjugado anti-selectina-P monoclonal (HRP) diluído a todos os poços, incluindo o poço branco. A placa foi incubada a temperatura ambiente durante 2 horas à 100 rpm. As tiras foram então lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem. Foram pipetados 100 μ L de solução de substrato TMB em todos os poços, incluindo os poços branco. Foi incubada a placa a temperatura ambiente cerca de 15 minutos a 100 rpm, ao abrigo da luz. A reação foi parada através da rápida pipetagem de 100 μ L de solução de paragem (solução ácido Fosfórico 1M) em cada poço, incluindo os brancos. A absorvância foi lida em 450 nm. Foi criada uma curva padrão locando as absorvâncias contra a concentração de selectina-P

solúvel e traçado um gráfico. Cada amostra teve sua absorvância interposta na curva para se determinar a concentração. Os valores obtidos foram multiplicados por 10, para corrigir a diluição inicial de 1:10. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante estão entre 67 e 126 ng/ml.

4.4.4 Determinação da concentração sérica de selectina-E

Foi determinado o número de tiras necessárias para testar as amostras mais o número apropriado de poços necessário para a execução do branco, controles e padrões. Cada amostra, padrão e branco foi testada em duplicata. As tiras foram lavadas 2 vezes com 400 μ L de "*Wash Buffer*". Adicionaram-se 100 μ L de diluente de amostras em todos os poços padrão. Foram preparadas diluições padrão por pipetagem de 100 μ L de selectina-E solúvel Standard duplicado, em poços A1 e A2. Após misturado, foram transferidos 100 μ L para B1 e B2 respectivamente e assim por diante até os poços F1 e F2 que tiveram 100 μ L descartados após a mistura. Foram criadas duas filas de selectina-E solúvel padrão com diluições que vão de 50-1,6 ng / mL. Adicionou-se 100 μ L de diluente de amostra, em duplicata, aos poços branco, e 80 μ L de diluente de amostras em todos os poços designados para as amostras. Adicionou-se 20 μ L de cada amostra em duplicata aos poços designados e misturou-se o conteúdo. Adicionou-se 50 μ L de HRP-Conjugado diluído a todos os poços, incluindo os poços branco. A placa foi coberta e incubada a temperatura ambiente durante 2 horas a 100 rpm. As tiras foram lavadas 3 vezes. A seguir foram pipetados 100 μ L de solução de substrato em todas as cavidades, incluindo os poços branco. As tiras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos a 100 rpm por 10 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela pipetagem de 100 μ L de solução de parada em cada poço, incluindo os poços branco. As absorvâncias foram lidas em 450 nm. Criou-se uma curva padrão concentração de selectina-E solúvel X absorvância, levando-se em consideração as diluições padrão feitas. As amostras foram interpoladas nos pontos de absorvância da curva e obtida a

concentração de cada uma. Multiplicou-se então este valor de concentração por 5, para corrigir a diluição inicial 1:5. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante estão entre 35,4 à 70,2 ng/ml.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos marcadores VCAM, ICAM, Selectinas-E e P, e dímeros-D foram comparados com o genótipo dos pacientes, características clínicas (presença de crise ou não, idade), índice de reticulócitos, porcentagem de hemoglobina fetal, leucometria e número de neutrófilos.

A comparação dos grupos foi realizada utilizando o teste t para as variáveis contínuas (quantificadas pela média) no que diz respeito às variáveis hematológicas e o teste de teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para os marcadores endoeliais, e pelo teste de qui-quadrado para as variáveis categóricas ou nominais. As correlações foram realizadas pelo método de Spearman. As comparações gráficas foram realizadas por gráficos de dispersão, com linha de tendência obtida por regressão linear e por gráficos do tipo Box-plot indicando o valor mínimo, a mediana, os intervalos quartis de 75% e 25% e os outliers presentes na amostra.

Em todas as análises foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Foram avaliadas 46 crianças e adolescentes com anemia falciforme, dos quais 16 estavam em crise de dor e 30 sem crise de dor. A idade mediana, em meses, e a característica genotípica, conforme a presença ou ausência da crise de

dor estão demonstradas na tabela 1. A mediana da idade dos pacientes com crise foi significativamente superior a dos pacientes sem crise.

TABELA 1: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E MEDIANA DE IDADE QUANTO À PRESENÇA DE CRISE DE DOR

		SEM CRISE (N=30)	COM CRISE (N=16)	VALOR DE p*
IDADE	Mediana (em meses)	57,5	109	0,048
GENÓTIPO	SS	10	9	0,273
	Sβ	8	2	
	SC	9	5	
	SD	3	0	

Nota: * teste t para variáveis contínuas, qui-quadrado para variáveis categóricas

5.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS QUANTO À PRESENÇA DE CRISE

A tabela 2 apresenta a comparação entre as medianas das variáveis hemoglobina, leucometria, contagem de neutrófilos e porcentagem de reticulócitos e hemoglobina fetal, entre os pacientes com e sem crise.

Não houve diferença entre as medianas dos grupos com crise e sem crise, quando foram comparados os valores de hemoglobina, leucócitos, reticulócitos e hemoglobina fetal. No entanto, comparando-se o número de neutrófilos, a diferença foi significativa.

TABELA 2. VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS E PRESENÇA OU NÃO DE CRISE

PARÂMETROS	SEM CRISE	COM CRISE	VALORES DE p
	Mediana	Mediana	
HEMOGLOBINA (g/dl)	8,8 (7,10-12,80)	8,8 (5,90-11,70)	0,31
LEUCOMETRIA (Número/mm ³)	11.160 (6.230-44.900)	13.180 (6.130-22.000)	0,95
CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS (Número/mm ³)	4.613 (2.367-15.266)	7196 (2.990-14.145)	0,01
RETICULÓCITOS (%)	8,6 (1,1-22,9)	6,0 (1,60-22,5)	0,34
HEMOGLOBINA FETAL (%)	6,1 (1,8-24,4)	8,0 (0,5-15,7)	0,1

5.3 MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E PRESENÇA OU NÃO DE CRISE

Ao se analisar os valores médios das moléculas de adesão sICAM-1, Selectinas-P e E, sVCAM-1 somente a variável sICAM-1 foi significativamente diferente, apresentando valor médio menor em pacientes com crise quando comparados aos pacientes sem crise; a variável dímeros-D apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes sem crise e aqueles com crise. (Tabela 3).

TABELA 3- VALORES MÉDIOS DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO E DÍMEROS-D EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE CRISE

MOLÉCULAS DE ADESÃO E DÍMEROS-D	SEM CRISE	COM CRISE	VALOR DE p *
sICAM (ng/ml)	255,33	117,63	0,002
SELECTINA-P (ng/ml)	181,53	163,19	0,146
SELECTINA-E (ng/ml)	146,30	133,25	0,518
sVCAM-1 (ng/ml)	5025,93	5059,31	0,872
DÍMEROS-D (µg/ml)	278,48	511,30	0,027

Nota: * Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon

5.4 MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E GENÓTIPOS DE DOENÇA FALCIFORME

Quanto à apresentação destas variáveis em comparação com os genótipos estudados, somente a variável sVCAM-1 difere significativamente, residindo a diferença entre os valores médios dos grupos SC e SS, ou seja, o valor médio da variável sVCAM-1 é significativamente menor nos pacientes com genótipo SC quando comparados aos pacientes com genótipo SS. As concentrações de sVCAM-1 foram aumentadas em todos os pacientes deste estudo (Tabela 4).

TABELA 4 - VALORES MÉDIOS DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO QUANTO AO GENÓTIPO DOS PACIENTES.

MOLÉCULAS DE ADESÃO E DíMEROS-D	GENÓTIPOS				VALOR DE p*
	SS	SB	SC	SD	
sICAM-1 (ng/ml)	194	257	165	324	0,694
SELECTINA-P (ng/ml)	181	186	160	171	0,237
SELECTINA-E (ng/ml)	161	147	109	153	0,097
sVCAM-1(ng/ml)	<u>5974</u>	4892	<u>3565</u>	6465	0,025
DÍMEROS-D (µg/ml)	178	378	487	388	0,140

Nota: * teste t

5.5 MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

Quanto à correlação entre os marcadores endoteliais e as variáveis hematológicas, conforme tabela 5, sVCAM-1 apresenta correlação moderada com as variáveis Hb e reticulócitos. A correlação observada com a variável Hb é negativa, ou seja, os valores de sVCAM-1 decrescem conforme aumentam os valores de Hb. Já a correlação observada com a porcentagem de reticulócitos é positiva, ou seja, os valores de sVCAM-1 aumentam conforme aumenta a porcentagem de reticulócitos (Figuras 8 e 9).

TABELA 5- CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES ENDOTELIAIS E AS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS

		Hb	RETIC.	HbF	LEUCÓC.	NEUTRÓF.
sICAM-1 (ng/ml)	r	-0,155	0,117	0,190	0,163	-0,125
	Valor de p	0,305	0,484	0,299	0,284	0,413
SELECTINA-P (ng/ml)	r	-0,064	0,253	-0,068	0,023	0,000
	Valor de p	0,673	0,125	0,710	0,881	0,997
SELECTINA-E (ng/ml)	r	-0,153	0,124	0,331	0,029	0,212
	Valor de p	0,310	0,457	0,064	0,851	0,161
sVCAM-1 (ng/ml)	r	-0,472**	0,593**	0,352*	0,247	0,250
	Valor de p	0,001	0,000	0,048	0,102	0,098
DÍMEROS-D (µg/ml)	r	-0,004	0,148	-0,111	0,102	0,151
	Valor de p	0,982	0,403	0,568	0,556	0,380

Nota: ** Correlação significativa; r = Coeficiente de correlação

FIGURA 8 -.CORRELAÇÃO ENTRE sVCAM-1(NG/ML) E HEMOGLOBINA(G/DL)

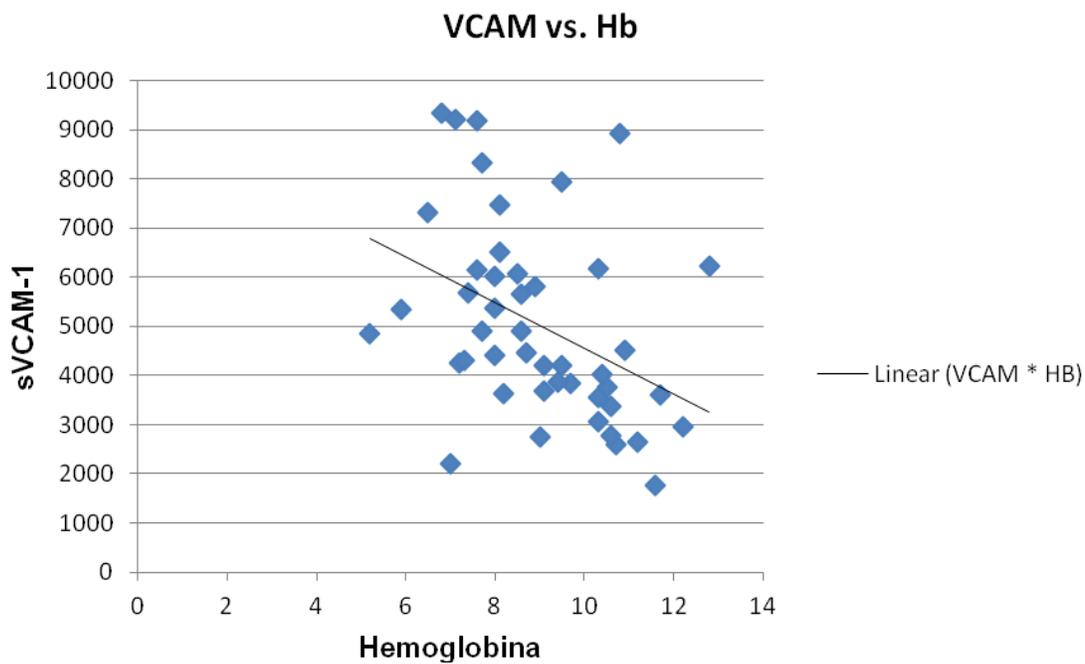


FIGURA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE sVCAM-1(ng/ml) E PORCENTAGEM DE RETICULÓCITOS

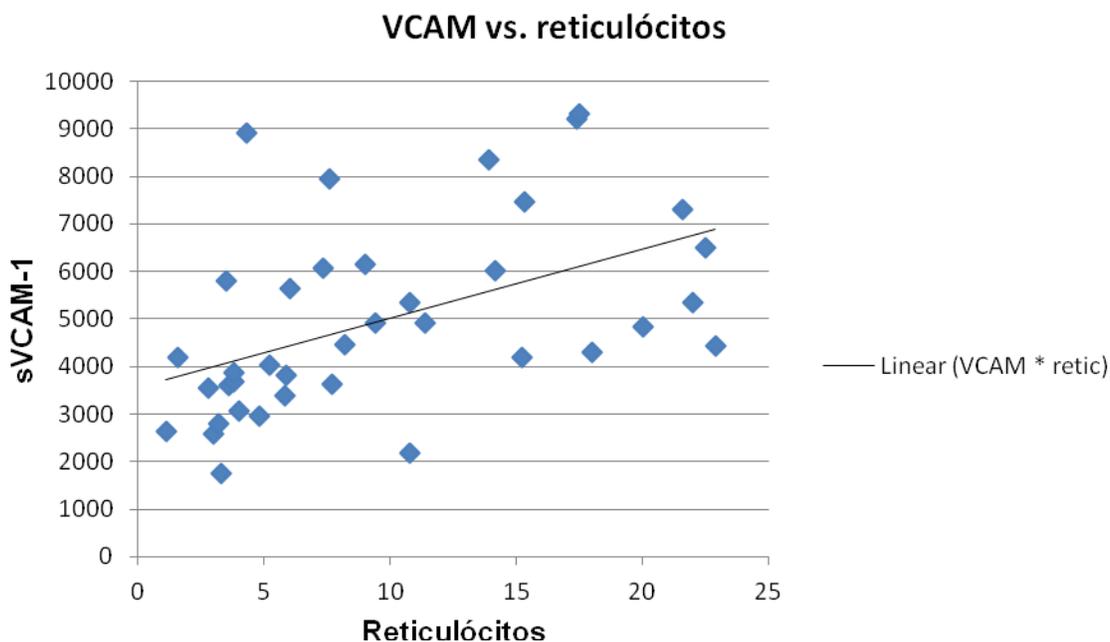


GRÁFICO 1 -: CURVA ROC PARA DÍMEROS-D

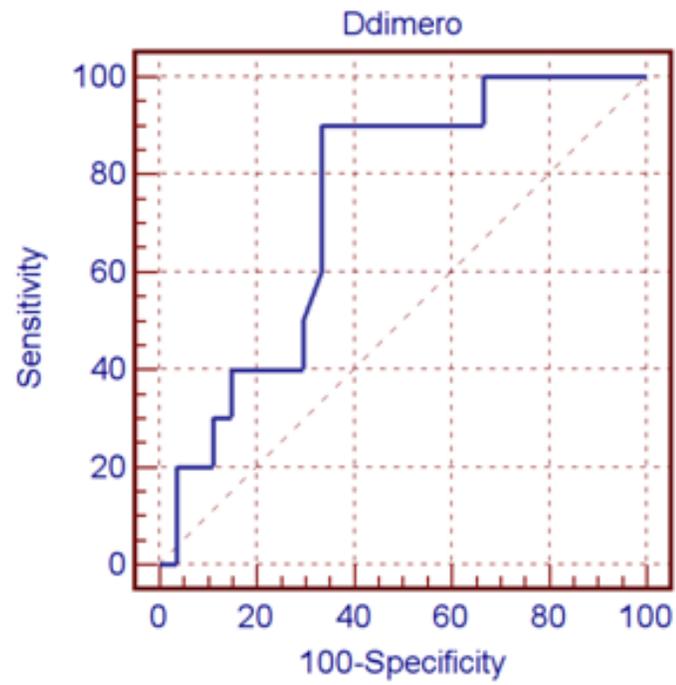
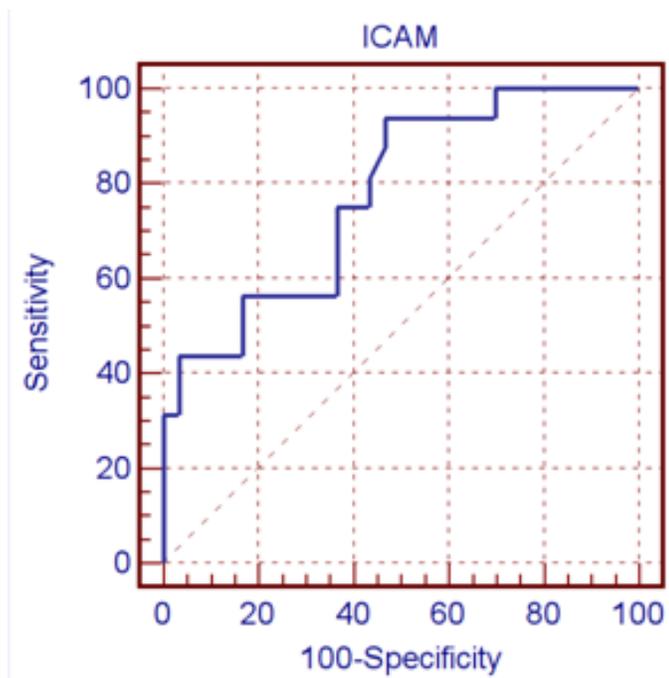


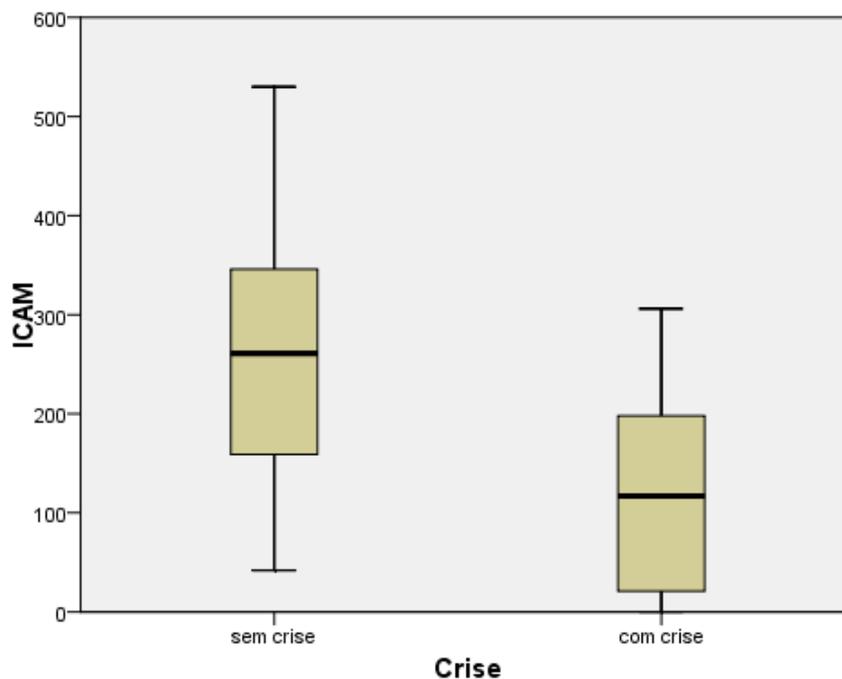
GRÁFICO 2 -: CURVA ROC PARA S-ICAM



5.8 PROBABILIDADE DAS VARIÁVEIS DE IDENTIFICAR A CRISE CLÍNICA

Gráficos de Box-plot indicam a posição dos valores médios e limítrofes de cada variável em relação à ocorrência de crise.

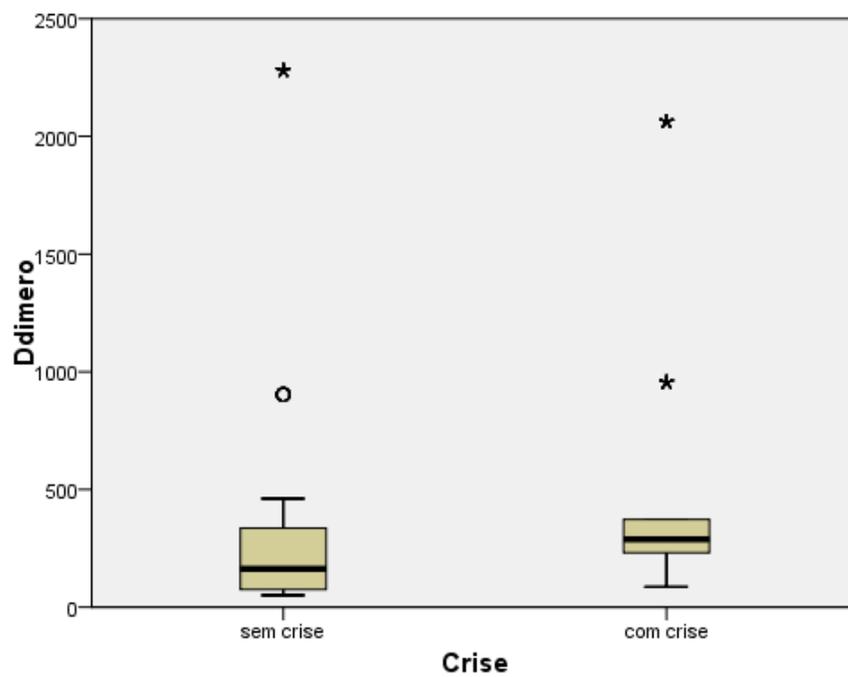
GRÁFICO 3 – VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE sICAM-1 EM PACIENTES COM E SEM CRISE



Os valores de s-ICAM foram menores nos pacientes com crise.

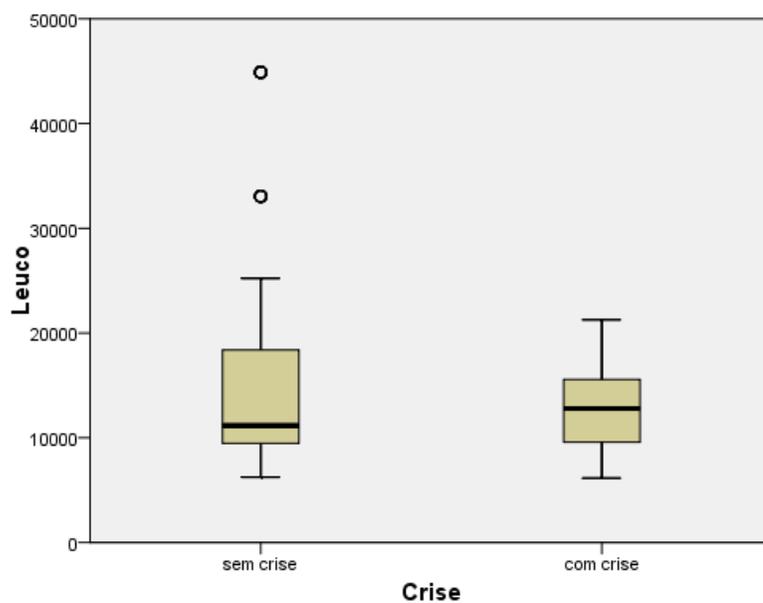
Os valores de sVCAM-1 foram semelhantes nos pacientes com e sem crise (aqui não demonstrados).

GRÁFICO 4 - VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE DÍMEROS-D EM PACIENTES COM E SEM CRISE



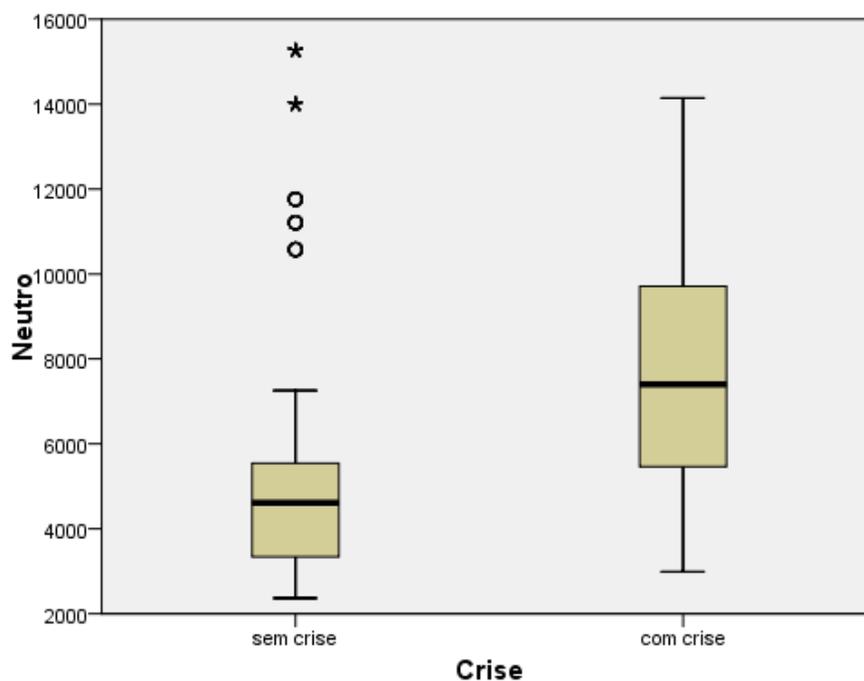
Os valores da variável dímeros-D foram maiores nos pacientes com crise, comparados com os sem crise.

GRÁFICO 5 - VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE LEUCÓCITOS EM PACIENTES COM E SEM CRISE



As contagens de leucócitos não apresentaram diferença significativa quanto à presença e ausência de crise, com média levemente superior nos pacientes em crise.

GRÁFICO 6 - VALORES MÉDIOS, MÍNIMO E MÁXIMO DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES COM E SEM CRISE



As contagens de neutrófilos apresentaram-se superiores nos pacientes em crise.

Analisando-se por regressão logística, observa-se que utilizando os valores de sICAM-1, é possível identificar crise clínica em 71% dos casos, ou seja, quando a concentração sérica de ICAM está diminuída, 71% dos pacientes são corretamente classificados como estando em crise ($p=0,01$). A mesma comparação para os valores de selectina-P apresenta $p=0,02$, para valores elevados e, para sVCAM-1, $p=0,06$.

Ainda por análise de regressão logística, as variáveis número de leucócitos ($p<0,001$), número de neutrófilos ($p=0,001$) e concentração de dímeros-D ($p=0,00a$), apresentam valores que caracterizam o grupo de pacientes com doença falciforme quanto à apresentação de crises.

6. DISCUSSÃO

Pacientes com doença falciforme diferem significativamente quanto à apresentação clínica. Em crianças, as complicações mais frequentes incluem infecções, dor, sequestro esplênico agudo, crise aplástica, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral. As crises vasclusivas podem se manifestar como dor no tórax, abdome, região lombar, membros superiores e inferiores, secundárias à falcização das células e consequente isquemia. A dor é fator limitante da boa qualidade de vida. Com o intuito de se identificar variáveis que pudessem prever maior risco de desenvolvimento de crises clínicas, procurou-se no presente trabalho analisar o comportamento de marcadores de lesão endotelial em pacientes com síndromes falciformes, classificados em dois grupos: em situação clínica basal, ou seja, sem intercorrências e aqueles na vigência de crise clínica. Considerou-se crise de dor a situação em que o paciente necessitou hidratação endovenosa e analgésico potente para controle da mesma. Não foi constituído grupo controle sem doença falciforme pelo fato de se pretender o acompanhamento do paciente e não a diferenciação diagnóstica.

6.1 NEUTRÓFILOS NA DOENÇA FALCIFORME

Vários estudos evidenciam que alta contagem de neutrófilos no sangue periférico em paciente com anemia falciforme é um indicador de gravidade clínica (PLATT *et al*, 1994).

A evidência de que os leucócitos participam do processo de doença nas hemoglobinopatias falciformes emergiu a partir de estudos que associam crises vasclusivas com infecção (KAUL *et al*, 1996; AHMED, 2011), leucocitose neutrofílica e risco aumentado de infecção (SERJEANT, 1985) e dor óssea aguda e grave e necrose de medula óssea, com infiltração por PMNs (PLATT *et al*, 1994; OKPALA, 1998; ATTAH, EKERE, 1987). A ligação dessas células à superfície endotelial, principalmente nos locais onde as citocinas inflamatórias são produzidas, pode reduzir o fluxo sanguíneo e, em associação com os eritrócitos falcizados, produzir oclusão microvascular e crise. LARD *et al*, 1999, observaram

diferenças significativas no estado de ativação de neutrófilos de pacientes assintomáticos falciformes em comparação com controles HbAA saudáveis, mediante diminuição significativa na expressão de selectina-L, aumento de CD64 (FADLON *et al*, 1998) e elevação das concentrações séricas de selectina-L, elastase e sCD16. Segundo esses autores, durante a crise vasclusiva, as diferenças foram ainda mais acentuadas, sugerindo que a ativação dos neutrófilos em pacientes falcêmicos é maior nos períodos de crise.

Os neutrófilos de pacientes com doença falciforme expressam constitutivamente CD18 ativo e respondem com sensibilidade aumentada à ativação das quimiocinas de aderência, aumentando assim a sua propensão para a aderência exuberante (LUM *et al*, 2004). O CD 18 é, na verdade resultado de três proteínas de adesão leucocitária, expressas em neutrófilos ativados, responsáveis pela firme adesão ao endotélio vascular, transmigração e adesão a partículas revestidas por C3b (RICHARD *et al*, 2005).

Por outro lado, em estudo realizado por Qari, *et al* (2011) os neutrófilos e monócitos de pacientes com anemia falciforme em crise foram significativamente diferentes daqueles com anemia falciforme sem crise, apresentando menor fagocitose com menos bactérias ingeridas e atividade reduzida de formação de radicais livres, como peróxidos e superóxidos, o que explicaria maior susceptibilidade à infecção, apesar de elevada contagem de neutrófilos e monócitos.

A constatação de que pacientes com doenças falciformes com maiores concentrações intracelulares de hemoglobina fetal apresentam menor morbidade orientou o uso terapêutico de hidroxiuréia, com objetivo de aumentar a concentração de HbF. Observou-se queda na contagem de neutrófilos, mesmo em pacientes que não apresentaram aumento da HbF (CHARACHE *et al*, 1995). Charache (1997) sugere que a contagem de PMNs seja um poderoso fator de acompanhamento na terapia com hidroxiuréia, sendo que ao reduzir o número de neutrófilos, espera-se melhora no quadro clínico do paciente, sugestão esta compartilhada por outros autores (GOLDMAN, 1989; ANYAEGBU *et al*, 1998; BAIN, 1996).

Os resultados do presente trabalho corroboram a idéia de que os neutrófilos participam do processo de vasclusão, pois houve diferença estatisticamente significativa, com maiores leucometrias às custas de PMN, em pacientes em crise. No presente estudo, apenas três pacientes faziam uso de hidroxiuréia, de tal forma que esta variável não foi incluída nas análises.

6.2 RETICULÓCITOS NA DOENÇA FALCIFORME

No processo de adesão ao endotélio vascular, na doença falciforme, se destacam os reticulócitos jovens, por apresentarem na sua superfície receptores para moléculas como VLA-4 e fibronectina. Quando os reticulócitos amadurecem, perdem a capacidade de se aderir ao endotélio, pela habilidade de se unir a ligantes como VCAM-1 e fibronectina, no entanto também se aderem ao endotélio dependendo de condições de seu ambiente. Reticulócitos mais jovens apresentam maior concentração de reticulina, mobilidade e formas irregulares, comparados com reticulócitos maduros. Ao amadurecer, reticulócitos liberam suas organelas para o plasma; esse processo, remodelação de membrana e exocitose de vacúolos autofágicos tem atividade pró-coagulante intensa.

Silva, *et al* (2011), avaliando 300 crianças com anemia falciforme, observaram que a contagem de reticulócitos é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença vascular cerebral. A aderência aumentada dos reticulócitos ao endotélio vascular pode ser a causa dessa associação (KATO *et al*, 2009).

Devido ao processo hemolítico crônico causado pela anemia falciforme, a contagem de reticulócitos se mostra aumentada em comparação com indivíduos normais (WALKE; WALDE, 2007)

Tshilolo, *et al* (2012) observaram que pacientes com >4,5% de células F desenvolveram menos crises dolorosas, e este parâmetro teve uma associação positiva com a contagem de reticulócitos, sugerindo que o menor número de células F e maiores porcentagens de reticulócitos contribuem para a gravidade da doença falciforme; esse estudo foi realizado na República Democrática do Congo,

e associação com processos infecciosos específicos podem ser causa de número aumentado de reticulócitos.

Diferentemente deste achado, Borba, et al (2003) verificaram a diminuição de reticulócitos a partir da terapêutica com hidroxiuréia, e perceberam que com a diminuição dos reticulócitos aumentava a concentração de hemoglobina fetal.

Somado a estes achado, compreende-se a importância do reticulócito citada por Silva, et al (2011) que perceberam que a contagem elevada de reticulócitos é o principal fator de risco associado com doença cerebrovascular em crianças com doença falciforme.

Dos 26 pacientes com mais de 3 anos, apenas 2 pacientes apresentavam *doppler* alterado e/ou acidente vascular cerebral, na presente casuística. As porcentagens de reticulócitos, por ocasião da coleta de sangue para as análises, foram respectivamente 17,4% e 22,9 %.

No presente trabalho, a contagem de reticulócitos não apresentou diferença significativa quando se comparou pacientes em crise clínica com pacientes sem crise. Entretanto, a contagem de reticulócitos apresentou correlação positiva com a concentração de sVCAM-1, podendo refletir um fator de risco para distúrbios de microcirculação. Sugere-se que um aumento na contagem de reticulócitos em pacientes com doença falciforme possa representar, mesmo que indiretamente, um fator de risco para distúrbios de microcirculação, nos pacientes com doença falciforme.

6.3 CONCENTRAÇÃO DE DÍMEROS-D NA DOENÇA FALCIFORME

O endotélio tem como função fisiológica facilitar o fluxo sanguíneo apresentando superfície anti-trombótica que inibe a adesão plaquetária e a coagulação (CINES *et al*, 1998). As células sanguíneas normais atuam de maneira ativa na manutenção da integridade endotelial; a aderência das hemácias ao endotélio pode dar origem à lentificação do fluxo sanguíneo e posterior oclusão vascular. O aumento da trombogenicidade está relacionado às propriedades pró-coagulantes dos eritrócitos falcizados como, por exemplo, a exposição da

fosfatidilserina na sua superfície, levando diretamente ao aumento da geração de trombina (SETTY *et al*, 2001). Como resultado da geração de trombina, há um aumento da atividade fibrinolítica, que pode ser identificado pela produção de dímeros-D da fibrina. Concentrações elevadas de dímeros-D são observadas tanto durante as crises de falcização quanto no estado basal e têm sido consideradas como marcadores de complicações relacionadas à doença de células falciformes (DEVINE *et al*, 1986).

Qari *et al*, (2012) perceberam que as concentrações plasmáticas de dímeros-D mostraram-se de duas a três vezes maiores em pacientes com anemia falciforme durante a crise de dor ou em estado estacionário em comparação com pacientes saudáveis, o que sugere um aumento no risco de trombose para pacientes com anemia falciforme.

Já em pacientes nigerianos com mesma doença, verificou-se um aumento significativo das concentrações de dímeros-D em pacientes no estado estacionário em comparação às de pacientes sem hemoglobinopatias, levando em conta mesmo sexo e idade, e que estas concentrações aumentam durante as crises vasclusivas (FAKUNLE *et al*, 2012). Em análise feita por Ahmed *et al*, (2004) também foi observado que pacientes com anemia falciforme em crise apresentam concentrações de dímeros-D maiores quando comparadas com as de pacientes em quadro clínico estável.

Diferenças significativas não foram encontradas nas concentrações de dímeros-D e atividade pró-coagulante entre os pacientes portadores de síndromes falciformes SS/SD/S β 0 e pacientes com síndromes falciformes SC/S β +, entretanto foram significativamente correlacionadas com marcadores de hemólise (lactato desidrogenase, bilirrubina indireta e hemoglobina) e com marcadores de adesão vascular solúvel (VCAM-1). Em pacientes no grupo talassemia SS/SD/S β 0 aumento na concentração plasmática de dímeros-D foi associado com história de acidente vascular cerebral. Em análise multivariada, concentrações elevadas de dímeros-D foram associadas com contagem de reticulócitos, lactato desidrogenase, peptídeo natriurético – marcador de insuficiência cardíaca - e história de acidente vascular cerebral (ATAGA *et al*, 2012).

Em um estudo desenvolvido por Javeed *et al*, (2010) confirmou-se a presença de elevados níveis de dímeros-D durante as crises dolorosas em pacientes falciformes sauditas, além da relação deste com a anormalidade ao raio-X de tórax. Este estudo também mostra que um raio-X de tórax anormal está quase sempre associado com concentração de dímeros-D elevada, e ainda sugere que quando se tem concentração de dímeros-D normal em paciente falciforme, se pode ter alguma garantia de que o paciente não está prestes a desenvolver uma complicação por falcização. Por outro lado, em pacientes com doença falciforme e quadro clínico pulmonar, um aumento na concentração plasmática de dímeros-D deve estimular avaliação ágil e completa do tórax, para procura de alteração torácica. Ainda segundo este estudo, não houve correlação entre concentrações de dímeros-D com concentração de hemoglobina, contagem de neutrófilos e plaquetas, o que corrobora os dados obtidos pelo nosso estudo.

Ataga *et al*, (2008) ao estudar pacientes com anemia falciforme verificou que estes apresentaram concentração plasmática mais elevada de marcadores da coagulação (trombina-antitrombina III, fragmento F1 +2 da protrombina, dímeros-D) e sVCAM em comparação com indivíduos controle. Foi detectado que pacientes com anemia falciforme e hipertensão pulmonar tinham níveis significativamente mais elevados de sVCAM em comparação com pacientes sem hipertensão pulmonar, o que confirma que aqueles tem maiores níveis de marcadores de ativação endotelial e outros marcadores inflamatórios do que pacientes sem hipertensão pulmonar. A tendência de aumento do nível de marcadores de ativação da coagulação foi observada em pacientes com doença falciforme com e sem hipertensão pulmonar. Os marcadores de hemólise se mostraram associados com a ativação da coagulação e disfunção endotelial em pacientes com anemia falciforme. A presença de hipertensão pulmonar não foi pesquisada na nossa população de estudo devido ser constituída primariamente por crianças e adolescentes e essa complicação ocorrer com maior freqüência em adultos. Contudo, a análise dos ecocardiogramas mostrou que não sugeriam hipertensão pulmonar.

No presente estudo, as concentrações de dímeros-D apresentam diferença estatística entre os grupos, sendo que pacientes com crise clínica apresentaram concentração de dímeros-D maior do que pacientes sem crise, corroborando a maioria dos dados encontrados na literatura. Sendo assim, evidencia-se a importância de dímeros-D em processos fibrinolíticos que se fazem presentes em pacientes portadores de doenças falciformes, como mostra a literatura.

Os resultados do presente trabalho revelam que dímeros-D são um marcador com baixa especificidade, implicando em dificuldade de se analisar este parâmetro isoladamente; contudo, se associado com outros marcadores pode trazer contribuição significativa, principalmente levando em conta a metodologia desta determinação que já se encontra de maneira bastante acessível na rotina clínica.

6.4 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE SELECTINAS-P e E

As selectinas constituem uma família de marcadores endoteliais estudados em várias situações patológicas. A selectina-P e a selectina-E fornecem oportunidades de estudos específicos de disfunções endoteliais, sendo que a selectina-P pode ser encontrada tanto no endotélio (nos corpúsculos de Weibel-Palade) quanto na superfície de grânulos alfa das plaquetas ativadas enquanto que a selectina-E é exclusiva do endotélio (FITZGERALD *et al*, 1986; TENAGLIA *et al*, 1997). Seu aparecimento na superfície endotelial acontece quando este é estimulado por algumas citocinas inflamatórias (IL 1 e 10, TNF- α). Quando expressas, as selectinas promovem a adesão do leucócito ao endotélio (JOANNIDES *et al*, 2006).

As interações entre a selectina-P e os seus ligantes contribuem para a adesão entre vários tipos de células, e nessas circunstâncias pode resultar na diminuição da circulação microvascular contribuindo para o desenvolvimento de situações vasoclusivas na doença falciforme, com consequente crise dolorosa para o paciente (TURHAN *et al*, 2002). Kutlar *et al*, (2012) evidenciou que a presença da selectina-P no endotélio microvascular é crítica para a oclusão

vascular nas doenças falciformes, e a sua concentração sérica, segundo Kato *et al*, (2005) e Blann, *et al* (2008) é aumentada em pacientes com doença falciforme em comparação com indivíduos normais.

Neste contexto Montes *et al*, (2002) verificou a capacidade da selectina-P em predizer a ocorrência de um evento cardiovascular adverso, e Burnette *et al*, (2011) e Embury, *et al* (2004) verificaram que o bloqueio da produção da selectina-P resulta na diminuição do processo vasclusivo em pacientes falciformes.

Matsui, *et al* (2001) já havia constatado que a inibição da selectina-P poderia ser considerada como uma abordagem potencial terapêutica para o tratamento das condições vasclusivas resultantes em dores das doenças falciformes.

De maneira semelhante acredita-se que o aumento da concentração sérica da selectina-E, observado na hipertensão arterial, deva refletir a disfunção do endotélio (GALEN, 2002). Em eventos cardiovasculares Roldan, *et al* (2003) observaram o aumento da concentração de selectina-E comparado com controles pareados por sexo e idade.

Hidalgo, *et al*, (2009) demonstraram que a selectina-E exibe uma grande importância para o envio de sinais de ativação de neutrófilos para sítios inflamatórios, e este evento pode culminar na fagocitose de eritrócitos circulantes e conseqüentemente redução do fluxo sanguíneo.

Lebensburger, *et al* (2012) concluiu que a hidroxiuréia, além de induzir a hemoglobina fetal, diminui a concentração sérica de selectina-E em humanos e em ratos, o que poderia contribuir para melhora clínica.

Não encontramos, na literatura, estudos avaliando o comportamento das selectinas em crianças com doença falciforme. No presente trabalho, tanto as concentrações de selectinas-P quanto de selectinas-E não diferiram significativamente ao se comparar pacientes em crise clínica e pacientes sem crise clínica; um dado interessante na presente análise é que a concentração de selectina-E apresentou correlação negativa com a idade dos pacientes, sugerindo

que crianças possam responder mais intensamente à lesão vascular com a produção de selectina-E, do que pacientes de mais idade.

6.5 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE sICAM-1 e sVCAM-1

Várias proteínas de adesão expressas no endotélio estão envolvidas na adesão dos eritrócitos falciformes (SUGIHARA, HEBBEL, 1992). Em 1993, Swelick *et al*, (1993) descreveram a participação de VCAM-1, na ligação do reticulócito do paciente falciforme ao endotélio. VCAM-1 e ICAM-1 são responsáveis pela firme aderência dos PMNS e concentrações elevadas de sICAM-1 foram encontradas nos pacientes falciformes. ICAM é expresso constitucionalmente no endotélio vascular e sua intensidade de expressão aumenta em resposta a vários estímulos, incluindo citocinas durante processos inflamatórios (ROTHLEIN *et al*, 1986; DUSTIN *et al*, 1986). Ambos, VCAM-1 e ICAM-1, existem na forma solúvel circulante no plasma, embora seus papéis fisiológicos ainda não estejam claramente definidos, sugerindo-se que elevadas concentrações reflitam a expressão aumentada pelas células endoteliais (SHIU *et al*, 2000). Duits *et al*, (1996), relataram concentrações aumentadas de sVCAM-1 em uma pequena amostra de pacientes e não observaram diferenças nas concentrações de sICAM-1, nesses mesmos pacientes. Benkerrou, *et al* (2002) demonstraram concentrações aumentadas de sICAM-1 em pacientes com doença falciforme em estado basal e em crises vasoclusivas.

Vilas-Boas *et al*, (2010) encontraram correlação positiva entre e a concentração de sVCAM-1 e sICAM-1 e o aumento da taxa hemolítica, avaliada pela análise das concentrações séricas de desidrogenase láctica, aspartato aminotransferase e contagem de reticulócitos.

Conran *et al*, (2004), demonstraram que concentrações aumentadas de sICAM-1 no plasma de pacientes com doença falciforme são revertidas pela hidroxiuréia. Também observaram correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de sVCAM-1 e sICAM-1, em pacientes no estado basal, sugerindo

que sofram alterações sob influência de mesmas variáveis e que as concentrações plasmáticas reflitam o estado de ativação do endotélio. Monchanin *et al*, (2008), analisaram as concentrações plasmáticas das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 em atletas com traço de células falciformes, com ou sem alfa-talassemia durante exercícios de resistência e após recuperação, e constataram que os pacientes com traço falciforme apresentavam maiores concentrações de sVCAM-1, tanto durante os exercícios quanto em repouso, quando comparados com os controles, sugerindo que apresentam risco aumentado para distúrbios da microcirculação.

Concentrações de sVCAM-1 encontram-se elevadas no soro de pacientes com câncer ou doenças inflamatórias. No estudo de Shiu *et al*, (2000), a liberação de sICAM-1 e sVCAM-1 não foi randômica e pareceu estar associada ao tipo de eritrócito ao qual a célula endotelial foi exposta.

DUIITS *et al*, (1996), observaram concentração de VCAM-1 aumentada em pacientes com doença falciforme assintomáticos em comparação com indivíduos controle. Em pacientes com crise vasclusiva a concentração de sVCAM-1 aumentou ainda mais e pareceu correlacionar com a evolução da crise.

No presente trabalho, obteve-se diferença estatística significativa ao se analisar as concentrações séricas de sICAM-1, sendo que estas foram menores para o grupo com crise do que para os pacientes sem crise. Esse dado é aparentemente contraditório, uma vez que se esperava encontrar maiores concentrações nos pacientes com crise. Uma possibilidade para explicar essa discrepância é que, talvez, as moléculas de sICAM-1 apresentem velocidade de depuração mais rápida na crise, não compensada pela sua produção. Não foram feitas determinações sequenciais para elucidar essa hipótese, as amostras foram coletadas apenas no início das crises. No entanto, 17 pacientes apresentaram valores maiores do que o valor médio de referência fornecido pelo fabricante, o que sugere sua participação nas crises de dor. Semelhante ao que se comentou quanto a análise de dímeros-D, não se pode utilizar este marcador de maneira isolada, pois, embora tenha apresentado sensibilidade de 93%, a especificidade é de 53% para valores abaixo de 225ng/ml.

Quando se analisam as concentrações de sVCAM-1, observa-se que não variaram comparando-se os pacientes no estado basal ou em crise clínica. Contudo, as concentrações de sVCAM-1 estão elevadas em todos os pacientes, de 2 a 11 vezes o valor máximo de referência (média de 550, com limites de 394 a 812ng/ml), demonstrando que crianças e adolescentes com doença falciforme apresentam risco aumentado para distúrbios da microcirculação. O achado de que concentrações de sVCAM-1 estão significativamente mais elevadas nos pacientes com genótipo SS, quando comparados com os pacientes SC, está de acordo com a maior morbidade clínica desse grupo. Além disso, nosso estudo encontrou correlação negativa de sVCAM-1 com a concentração de Hb, ou seja, quanto maiores as concentrações de hemoglobina menores são as concentrações de sVCAM-1, fato corroborado pela literatura, que cita menores concentrações de hemoglobina associadas a maior morbidade.

7. CONCLUSÕES

A análise dos marcadores de lesão endotelial, em pacientes com doença falciforme com crise comparados com os pacientes sem crise, permite concluir que:

- 1- Apenas as concentrações de sICAM, dímeros-D e contagem de neutrófilos apresentaram diferença significativa entre os grupos, com $p=0,002$, $p=0,027$ e $p=0,01$, respectivamente, sendo que os valores de sICAM foram menores para o grupo em crise do que para os pacientes sem crise. Os marcadores sICAM-1 e dímeros-D não representam individualmente bom parâmetro para se diferenciar um quadro de crise clínica de um quadro clínico estável de acordo com seu percentual de especificidade, entretanto a utilização associada destes marcadores pode auxiliar na identificação de crise clínica vasclusiva.

- 2- Quanto à análise da associação dos marcadores de lesão endotelial com as variáveis hematológicas, observa-se que a concentração sérica de sVCAM-1 apresenta correlação negativa com a concentração plasmática de Hb. Entretanto o percentual de reticulócitos apresentou relação positiva com sVCAM-1. Sendo assim, sugere-se que o aumento na concentração de Hb seja um fator protetor para distúrbios da microcirculação, e o aumento no percentual de reticulócitos seja um fator de risco para tais distúrbios. Não houve diferença entre os grupos com crise e sem crise, quando foram comparados os valores de hemoglobina, reticulócitos, hemoglobina fetal, leucócitos e neutrófilos.

- 3- As variáveis sICAM-1, dímeros-D e selectinas-P não sofreram influência da idade ou do tipo de doença falciforme (SS, SB, SC), entretanto a concentração de sVCAM-1 apresentou maiores valores em pacientes SS do que SC, o que está de acordo com a maior morbidade descrita em pacientes SS. A selectina-E apresentou correlação negativa com a idade, sugerindo que crianças possam responder mais intensamente à lesão vascular com a produção de selectina-E, do que pacientes de mais idade.

Esse estudo demonstra que mesmo em pacientes pediátricos com doença falciforme já podem ser constatadas alterações nas concentrações de moléculas de adesão vascular descritas na literatura para pacientes adultos, evidenciando que os fatores de risco associados a alterações da microcirculação já estão presentes nas crianças, o que suscita o interesse pela identificação de tratamentos que possam ser utilizados precocemente, diminuindo a morbi-mortalidade relacionada às síndromes falciformes.

8. REFERÊNCIAS

AHMED, S.; SIDDIQUI, A. K.; IGBAL, U.; SISON, C. P.; SHAHID, R. K.; SHETH, M.; PATEL, D. V.; RUSSO, L. A. Effect of low-dose warfarin on D-dimer levels during sickle cell vaso-occlusive crisis: a brief report. *Eur J Haematol.* Mar;72(3):213-6, 2004

AHMED, S. G. The role of infection in the pathogenesis of vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell disease. *Mediterr J hematomol Infect Dis* 2011; 3; Open Journal System.

ANYAEGBU, C. C.; OKPALA, I. E.; AKEN'OVA, A. Y.; SALIMONU, L. S. Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia *Eur. J. Haematol.*, pp. 267–268, 1998

ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-Dependent Impairment of Vascular Function in Sickle Cell Disease. *Free Radical Biology & Medicine*, v.43, p.1469-1483, 2007.

ATAGA, K. I.; ORRINGER, E. P.; Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med.* 115:721-8, 2003.

ATAGA, K. I.; MOORE, C. G.; HILLERY, C. A.; JONES, S.; WHINNA, H. C.; STRAYHORN, D.; SOHIER, C.; HINDERLITER, A.; PARISE, L. V.; ORRINGER, E. P. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica.* 93(1):20-6, 2008.

ATAGA, K. I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias. *Haematologica.* 94(11):1481–1484. 2009

ATAGA, K. I.; BRITAIN, J. E.; DESAI, P.; MAY, R.; JONES, S.; DELANEY, J.; STRAYHORN, D.; HINDERLITER, A.; KEY, N. S. Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. *PLoS One.*7(1):e29786. Epub 2012 Jan 11, 2012.

ATTAH, E. B.; EKERE, M. C. Death patterns in sickle cell anaemia *JAMA*, 233, pp. 890–899, 1987.

BAIN, B. J. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. *J. Clin. Pathol.* 49, pp. 664–666, 1996.

BALLAS, S. K.; MOHANDAS, N. Sickle red cell mocrorheology and sickle blood rheology microcirculation. 11:209-225, 2004

BELCHER, J. D.; MARKER, P. H.; WEBER, J. P.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 96:2451–2459, 2000

BENKERROU, M.; DELARCHE, C.; BRAHIMI, L.; FAY, M.; VILMER, E.; ELION, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1;99(7):2297-303, 2002.

BLANN, A. D. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost.* 95:49-55, 2006

BLANN, A. D.; MOHAN, J. S.; BAREFORD, D.; LIP, G. Y. Soluble P-selectin and vascular endothelial growth factor in steady state sickle cell disease: relationship to genotype. *J Thromb Thrombolysis.* 25(2):185–189, 2008..

BLUM, A.; YEGANEH, S.; PELEG, A.; VIGDER, F. KRYUGER, K.; KHATIB, A.; KHAZIM, K.; DAUERMAN, H. Endothelial Function in Patients With Sickle Cell Anemia Douring and After Sicle Cell Crises. *Journal of Trombosis and Thrombolysis.* 19(2), 83-86, 2005

BORBA, R.; LIMA, C. S.; GROTTTO, H. Z. Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. *J Clin Lab Anal.* 2003;17(2):66-72.

BRUGNARA, C. Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *J Pediatr Hematol Oncol.* 25(12):927-33, 2003

BUNN, H.F. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 1997; 337 : 762-9.

BURNETTE, A. D.; NIMJEE, S. M.; BATCHVAROVA, M.; ZENNADI, R.; TELEN, M. J.; NISHIMURA, J.; SULLENGER, B. A. RNA aptamer therapy for vaso-occlusion in sickle cell disease. *Nucleic Acid Ther.* 21(4):275-83, 2011.

CHARACHE, S.; TERRIN, M. L.; MOORE, R. D.; *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crisis in sickle cell anemia *N. Engl. J. Med.*, 322, pp. 1314–1322, 1995.

CHARACHE, S. The mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anaemia in adults. *Semin. Hematol.*, 34 (suppl 3), pp. 15–21, 1997

CHARACHE, S.; DOVER, G.J.; MOORE, R.D. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*.1992;79:2555–2565.

CINES, D. B.; POLLAK, E. S.; BUCK, C. A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G. A.; McEVER, R.; POBER, J. S.; WICK, T. M.; KONKLE, B. A.; SCHWARTZ, B. S.; BARNATHAN, E. S.; McCRAE, K. R.; HUG, B. A.; SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 91:3527-3561, 1998.

CONRAN, N.; FATTORI, A.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Increased levels of soluble ICAM-1 in the plasma of sickle cell patients are reversed by hydroxyurea. *Am J Hematol*, 76(4):343-7, 2004.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; COSTA, F.F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*. 2009;33(1):1-16. Review.

DAMPIER, C.; SETTY, B.; EGGLESTON, B.; BRODECKI, D.; O'NEAL, P.; STUART, M. Vaso-occlusion in children with sickle cell disease: clinical characteristics and biologic correlates. *J Ped Hem/Oncol* 26:785–790, 2004

DEVINE, D. V.; KINNEY, T. R.; THOMAS, P. F.; ROSSE, W. F.; GREENBERG, C. S. Fragment D-dimer levels: an objective marker of vaso-occlusive crisis and other complications of sickle-cell disease. *Blood*. 68(1):317-9,1986.

DIGGS, L. W. Sickle cell crises. *Am J Clin Pathol* 44:1, 1965.

DWORKIS, D. A.; KLINGS, E. S.; SOLOVIEFF, N.; LI, G.; MILTON, J. N.; HARTLEY, S. W.; MELISTA, E.; PARENTE, J.; SEBASTIANI, P.; STEINBERG, M. H.; BALDWIN, C. T. Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. *Am J. Hematol*. 86(2):220-3. 2011.

DUIITS, A. J. ; PIETERS, R. C. ; SALEH, A. W. , et al. Enhanced levels of soluble VCAM-1 in sickle cell patients and their increment during vasoocclusive crisis. *Clin Immunol Immunopathol* 81(1):96–98. 1996

DUSTIN, M. L.; ROTHLEIN, R.; BHAN, A. K.; DINARELLO, C. A., SPRINGER, T. A. Induction by IL-1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol*, 137-:245, 1986.

ELDOR, A.; RACHMILEWITZ, E. A. The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood*. 99:36-43, 2002

EMBURY, S. H.; MATSUI, N. M.; RAMANUJAM, S.; MAYADAS, T. N.; NOGUCHI, C. T.; DIWAN, B. A.; MOHANDAS, N.; CHEUNG, A. T. The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo. *Blood*, 15;104(10):3378-85, 2004.

FADLON, E.; VORDERMEIER, S.; PEARSON, T. C.; MIRE-SLUIS, A. R.; DUMONDE, D. C.; PHILLIPS, J.; FISHLOCK, K.; BROWNSKA. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood*, 91(1), 266-274, 1998.

FAKUNLE, E. E.; ETENG, K. I.; SHOKUNBI, W. A. D-D dimer levels in patients with sickle cell disease during bone pain crises and in the steady state. *J Pathol and Lab Med International*. V.4 p21 – 25, 2012

FITZGERALD, D.; ROY, L.; CATELLA, F.; FITZGERALD, G. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Eng J Med*. 315:983-9, 1986.

FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: Multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*, 9(2):101, 2002

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*. 117(4):850-8. 2007

GALEN, F. X. Cell adhesion molecules in hypertension: endothelial markers of vascular injury and predictors of target organ damage? *J Hypertens*. 20:813-6. 2002

GIBSON, J. S.; ELLORY, J. C. Membrane transport in sickle cell disease. *Blood Cells Mol Dis*. 28(3):303-14. 2002

GILMAN, J. G.; HUISMAN, T. H. J. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood*. 66 (4):783-7. 1985

GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N.; OGNIBENE, F. P., et al. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*. 107(2):271– 278. 2003

GLADWIN M.T.; VICHINSKY, E. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2008 NOV 20;359(21):2254-65.

GOLDMAN, J. M. Granulocytes, monocytes, and their benign disorders A.V Hoffbrand, S.M Lewis (Eds.), *Postgraduate Haematology, Butterworth Heinemann, Oxford*, pp. 294–324, 1989

GONZALEZ-SIMON, A.L.; ENIOLA-ADEFESO, O. Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Host Response to Biomaterials. *Cambridge: Springer*, pp. 143–158, 2012.

GRAIDO-GONZALES, E.; DOHERTU, J. C.; BERGREEN, E. W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; McMILLEN, M. A. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. *Blood*. 92 (7): 2551-5, 1998.

HAGGER, D.; WOLFF, S.; OWEN, J.; SAMSON, D. Changes in coagulation and fibrinolysis in patients with sickle cell disease compared with healthy black controls. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 6(2):93–99. 1995

HEBBEL, R. P. Adhesive Interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *Journal Clinical Invest*. 99(11) 1997

HEBBEL, R. P. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. *N Engl J Med*. 2000 Jun 22;342(25):1910-2.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Yale J Biol Med* 74(3):179-84, 1910.

HIDALGO, A.; CHANG, J.; JANG, J. E.; PEIRED, A. J.; CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nat Med*. 15(4):384–39, 2009.

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105, n.33, p 11595-11596, 2008

JAVEED, D.; INAM, M.; HILALI, H.; TAJ, E.; AL, M.; ZIVANI, C.; IMAD S. A. Raised D-dimer levels in acute sickle cell crisis and their correlation with chest X-ray abnormalities *Ger Med Sci*. 8: Doc 25, 2010.

JOANNIDES, R.; BELLIN, J.; THUILLEZ, C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function: a focus on resistance arteries. *Fundam Clin Pharmacol*. 20:311-20. 2006

JOHN, R.; PANCH, S.; HRABE, J.; WEI, P.; SOLOVEY, A.; JOYCE, L., HEBBEL, R. Activation of Endothelial and Coagulation Systems in Left Ventricular Assist Device Recipients. *The Annals of Thoracic Surgery* V. 88, Issue 4, Pages 1171-1179, 2009.

KAN, Y. M.; DOZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 5631-5, 1978.

KANAVAKI, I.; MAKRYTHANASIS, P.; LAZAROPOULOU, C.; KATTAMIS, A.; TZANETEA, R.; KALOTYCHOU, V.; ROMBOS, I.; PAPASSOTIRIOU, I. Adhesion molecules and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with sickle cell beta-thalassaemia. *Eur J Clin Invest* 42(1):27-33, 2012

KATO, G. J.; MARTYR, S.; BLACKWELDER, W. C.; et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol*. 130(6):943–953, 2005.

KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American Journal of Hematology*, v.84, n.9, p.618-625, 2009.

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

KEARON, C.; JULIAN, J. A.; NEWMAN, T. E.; GINSBERG, J. S. Noninvasive diagnosis of deep venous thrombosis. McMaster Diagnostic Imaging Practice Guidelines Initiative. *Ann Intern Med.* 128:663-77, 1998

KLIMIUK, P. A.; SIERAKOWISKI, S.; LATOSIEWICZ, R.; CYLWIK, J. P.; CYLWIK, B.; SKOWRONSKI, J.; CHIWIECKO, J. Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with variants of rheumatoid synovitis. *Ann Rheum Dis* 61: 804-9, 2002.

KULOZIK, A. E. *et al.* Geographical survey of bS-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am. J. Hum. Genet.*, 39: 239-44, 1986.

KUTLAR, A.; ATAGA, K. I.; McMAHON, L.; HOWARD, J.; GALACTEROS, F.; HAGAR, W.; VICHINSKY, E.; CHEUNG, A. T.; MATSUI, N.; EMBURY, S. H. A potent oral P-selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*, 87(5):536-9, 2012.

KUVIBIDILA, S. R.; SANDOVAL, M.; LAO, J.; VELEZ, M.; YU, L.; ODE, D.; GARDNER, R.; LANE, G.; WARRIER, R. P. Plasma zinc levels inversely correlate with vascular cell adhesion molecule-1 concentration in children with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 98(8):1263-72, 2006.

LARD, L.R.; MUL, F.P.; HAAS, M.; ROOS, D., DUIJS, A. J. Neutrophil activation in sickle cell disease. *J Leukoc Biol.* 66(3):411-5, 1999.

LEBENSBURGER, J. D.; HOWARD, T.; HU, Y.; PESTINA, T. I.; GAO, G.; JOHNSON, M.; ZAKHARENKO, S. S.; WARE, R. E.; TUOMANEN, E. I.; PERSONS, D. A.; ROSH, J. W. Hydroxyurea therapy of a murine model of sickle cell anemia inhibits the progression of pneumococcal disease by down-modulating E-selectin. *Blood*, 23;119(8):1915-21, 2012.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9):678–689, 2007.

LU, M.; Perez, V. L.; MA, N. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1808–1812, 1999.

LUM A. F.; WUN, T.; STAUNTON, D.; SIMON, S. I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. *Am J Hematol*, 76(2):126-33, 2004.

MATSUI, N. M.; BORSIG, L.; ROSEN, S. D.; YAGHMAI, M.; VARKI, A.; EMBURY, S. H. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. *Blood*. 15;98(6):1955-62, 2001.

MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Cell-cell interactions: leucocyte-endothelial interactions. *Current Opinion in Hematology*. 10:150-8, 2003.

MONCHANIN, G.; SERPERO, L. D.; CONNES, P.; TRIPETTE, J.; WOUASSI, D.; FRANCINA, A.; MASSARELLI, R.; GOZAL, D.; THIRIET, P.; MARTIN, C. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without α -thalassemia during endurance exercise and recovery. *Clin Hemorheol Microcirc* 40(2):89-97, 2008

MONTES, R. A.; ECKMAN, J. R.; HSU, L. L.; WICK, T. M. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: Role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *Am J Hematol*. 70(3):216–227, 2002.

NAGEL, R. L. *et al.* Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. *N. Engl. J. Med.*, 312: 880-4, 1985.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. *Doença das Células Falciformes*. 1ed, São Paulo, SP: Sarvier, 2004.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH NATIONAL HEART, LUNG , AND BLOOD INSTITUTE - *Division of Blood Diseases and Resources: The Management of Sickle Cell Disease* - NIH Publication No. 02-2117. 188 pages. Revised May28, 2002 (Forth Edition) disponivel em: www.nhlbi.nih.gov/health/prof/blood/sickle/sc_mngt.pdf

NETO, G. C. G.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da Anemia Falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, V. 39, n 1 pag 51 a 56, 2003.

NSIRI, B.; GRITLI, N.; BAYOUDH, F.; MESSEAUD, T.; FATTOUM, S.; MACHGHOUL, S. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in homozygous sickle cell disease. *Hematol Cell Ther*. 38(3):279–284, 1996.

OKPALA, I. E. The management of crisis in sickle cell disease (review) *Eur. J. Haematol.*, 68 (1998), pp. 1–6

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder. *Blood Reviews*. 8:65-73, 2004.

OPA/OMS Organização Pan-Americana da Saúde. Escritório de Representação no Brasil (1998). *A Saúde no Brasil*. Disponível em: <HTTP://www.opas.org.br/sistema/arquivos/SAUDEBR.PDF>

PAGNIER, J.; *et al.* Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 1771-3, 1984.

PARHAM, P. *O Sistema imune*. Porto Alegre, RS: Artmed, 2001.

PAULING, L.; ITANO, H.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 110:543-548, 1949.

PERUTZ, M. F. Molecular pathology of human haemoglobin. *Biochimie*. 54(5):621, 1972.

PLATT, O. S. Easing the suffering caused by sickle cell disease. *N Engl J Med* 330(11):783-4, 1994

PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D. J.; ROSSE, W. F.; MILNER, P. F.; CASTRO, O.; STEIBERG, M. H.; KLUG, P. P. Mortality in Sickle Cell Disease – Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. *N Engl J Med* 330(23): 1639-1644, 1994.

PLATT, O. S.; DOVER, G. J. Sickle cell disease. In: Nathan, DG and Oski, FA (ed.): *Hematology of infancy and childhood*, 4th ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, pg 732-782, 1992.

PLATT, O. S.; *et al.* Pain in Sickle Cell Disease – Rate and risk factors. *N. Engl. J. Med.* v. 325, n. 1, p. 11-16, 1991.

QARI, M. H.; DIER, U.; MOUSA, S. A. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 18(2):195-200, 2012.

QARI, M. H.; ZAKI, W. A. Flow cytometric assessment of leukocyte function in sickle cell anemia. *Hemoglobin*. 35(4):367-81, 2011.

RICHARD, E ed BEHMAN, et al. *Nelson Tratado de Pediatria*. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

ROHSIG, L. M.; DAMIN, D. C.; STEFANI, S. D.; CASTRO, C. G. J.; ROISENBERG, I.; SCHWARTSMANN, G.; von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Res*. 34:1125-9, 2001.

ROLDAN, V.; MARIN, F.; LIP, G. Y.; BLANN, A. D. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost*. 90:1007-20, 2003

ROTHLEIN, R.; DUSTIN, M. L.; MARLIN, S. D.; SPRINGER, T. A. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol*. 137:245, 1986

SANTELO, J. L.; RODRIGUES, C. I. S. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 20(2) p 228-231, 1998.

SCHMIDT, E. P.; LEE, W. L.; ZEMANS, R. L.; YAMASHITA, C.; DOWNEY, G. P. On, around, and through: neutrophil-endothelial interactions in innate immunity. *Physiology*, 26(5):334–347, 2011.

SEELY, A. J.; PASCUAL, J. L.; CHRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care*, 7(4):291–307, 2003.

SERJEANT, G. R. A doença da célula falciforme. *Anais Nestlé*. 58:11-22, 1999

SERJEANT, G. R. *Sickle Cell Disease*. New York. NY Oxford, 1985, p 296

SETTY, B. N.; RAO, A. K.; STUART, M. J. Thrombophilia in sickle cell disease: the red cell connection. *Blood*, 98(12):3228-33, 2001.

SHIU, Y. T.; UDDEN, M. M.; McINTIRE, L. V. Perfusion with sickle erythrocytes upregulates ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Blood*, v. 95, n.10, p. 3232-3241, 2000.

SILVA, C. M.; GIOVANI, P.; VIANA, M. B. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*, 56(1):116-21, 2011

SOLOVEY, A. A.; HARKNESS, J.; HEBBEL, R. P. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*, 97(7) 1937-41, 2001.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle cell disease. *Lancet*, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

SUGIHARA, K.; HEBBEL, R. P. Multiple mechanisms of sickle erythrocyte adherence to vascular endothelial cells. *Clin Hemorehol*, 12:185, 1992.

SUTTON, M.; ATWEH, G. F.; CASHAMN, T. D.; DAVIS, W. T. Resolving Conflicts: misconceptions and myths in the care of the patient with sickle cell disease. *Mt Sinai J Med* 66(4): 282 – 285, 1999.

SWELICK, R. A.; ECKMAN, J. R.; KUMAR, A.; JEITLER, M.; WICK, T. M. A2b1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. *Blood* 82:1891-1899, 1993.

TELEN, M. J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. *Seminars in Hematology*, v.37, n.2, p.130-142, 2000.

TENAGLIA, A. N.; BUDA, A. J.; WILKINS, R. G.; BARRON, M. K.; JEFFORDS, P. R.; VO, K.; et al. Levels of expression of P-selectin, E-selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in coronary atherectomy specimens from patients with stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 79:742-47, 1997.

THORNBURG; C.D.; FILES, B.A.; LUO, Z.; MILLER, S.T.; KALPATTHI, R.; IYER, R.; SEAMAN, P.; LEBENSBURGER, J.; ALVAREZ, O.; THOMPSON, B.; WARE, R.E.; WANG, W.C. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. *Blood*. 2012 Aug 22.

TITUS, J.; CHARI, S. GUPTA, M.; PAREKH, N. Pro-oxidant and antioxidant status in patients of sickle cell anemia. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v.19, n.2, p.168-172, 2004.

TOMER, A.; HARKER, L. A.; KASEY, S.; ECKMAN, J. R. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med*. 137(6):398–407, 2001.

TSHILOLO, L.; SUMMA, V.; GREGORJ, C.; KINSIAMA, C.; BAZEBOSO, J. A.; AVVISATI, G.; LABIE, D. Foetal haemoglobin, erythrocytes containing foetal haemoglobin, and hematological features in congolese patients with sickle cell anaemia. *Anemia*. 2012:105349, 2012.

TURHAN, A.; WEISS, L. A.; MOHANDAS, N.; COLLER, B. S.; FRENETTE, P. S. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(5):3047–3051, 2002.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B. A.; ZANETTE, A. M.; REIS, M. G.; BARRAL-NETTO, M.; GONÇALVES, M. S. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. *Ann Hematol*, 89(9):877-82, 2010.

WALKE, V. A.; WALDE, M. S. Haematological study in sickle cell homozygous and heterozygous children in the age group 0-6 years. *Indian J Pathol Microbiol*, 50(4):901-4, 2007.

WAUTIER, J. L.; WAUTIER, M. P. Molecular basis of red blood cell adhesion to endothelium. *Ann Pharm Fr*. 69(1):3-6, 2011.

WHO (World Health Organization). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control: a guide for programme managers. *Geneve: The Organization*; 2001.

YEDGAR, S.; KOSHKARYEV, A.; BARSHEIN, G. The red blood cell in vascular occlusion. *Pathophysiology Haemostasis and Thrombosis*, v. 32, p. 263-268, 2002.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

ZAMARO, P.J.A.; CANALLI, A.A.; JÚNIOR, W.A.S.; DOMINGOS, C.R.B. Diagnóstico Laboratorial das Hemoglobinas Semelhantes à HbS. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. vol.38 no.4 Rio de Janeiro 2002

9. APÊNDICES

9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

**TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL COMO
MARCADORES DE CRISES VASO-OCCLUSIVAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Investigador: Paulo Roberto Merisio / Mara Albonei Dudeque Pianovski

**Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do
Paraná**

**Endereço e telefone (celular): Av. Julio Assis Cavalheiro, 1361, centro,
Francisco Beltrão – Paraná CEP 85601-000 fone: 46 88078288**

9. PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

Este estudo pretende analisar alterações sanguíneas encontradas nos pacientes portadores de doenças falciformes, que possam estar relacionadas ao processo de vasoclusão, responsável pelas complicações da doença.

PROPÓSITO DO ESTUDO

A investigação consiste em descobrir a utilidade de marcadores laboratoriais já existentes para monitorar o processo de vasoclusão quando este se inicia, e tentar prevê-lo evitando assim, ou tendo alternativas para amenizar suas complicações.

SELEÇÃO

Os pacientes selecionados são pacientes portadores de doenças falciformes, com idade até 18 anos. Serão incluído 30 pacientes em crise vasoclusiva e 30 pacientes em estado basal.

10. PROCEDIMENTOS

Os voluntários serão submetidos à uma coleta sanguínea, realizada por profissional capacitado, e este material obtido será armazenado e transportado ao laboratório do Hospital de Clínicas. No laboratório, será realizado um hemograma, dosagem de dímeros-D, ICAM, VCAM, selectina-E e selectina-P. Os níveis destes marcadores serão comparados em pacientes com crise e pacientes em estado basal. O único desconforto que o paciente sofrerá é o procedimento da coleta. O benefício obtido com este estudo é o fato de saber se há possibilidade de prever episódios de vasoclusão em pacientes falciformes com a utilização destes

marcadores, sendo que trará uma melhor qualidade de vida para estes pacientes caso o estudo se comprove.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe PAULO ROBERTO MERISIO, FONE: 46 88078288. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com

conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
<u>Paulo Roberto Merisio</u>	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR (Pessoa que aplicou o TCLE)	ASSINATURA	DATA