



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



---

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *DUFFY* COM A  
GRAVIDADE DA DOENÇA FALCIFORME**

**KATIANE DOS SANTOS GOMES**

**MANAUS**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



---

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *DUFFY* COM A**  
**GRAVIDADE DA DOENÇA FALCIFORME**

**KATIANE DOS SANTOS GOMES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador: Prof. Dr. Sergio Roberto L. de Albuquerque**

**MANAUS**

**2014**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633e Gomes, Katiane dos Santos  
Estudo da associação dos polimorfismos DUFFY com a gravidade da Doença Falciforme / Katiane dos Santos Gomes . 2014  
75 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Sergio Roberto Lopes Albuquerque  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Doença Falciforme. 2. Genotipagem. 3. Hemoglobina. 4. Polimorfismo. 5. Sistema Duffy . I. Albuquerque, Sergio Roberto Lopes. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**Katiane dos Santos Gomes**

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *DUFFY* COM A SEVERIDADE DA  
DOENÇA FALCIFORME**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública realizada em:

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**Banca examinadora:**

---

Dr. Sérgio Roberto Lopes de Albuquerque  
Universidade Federal do Amazonas/UFAM  
**Presidente**

---

Dra. Mariza Aparecida Mota  
Médica Hematologista do Hospital Israelita Albert Einstein  
**Examinador (1)**

---

Dr. Luiz Antônio Boechat Lopes  
Universidade Federal do Amazonas/UFAM  
**Examinador (2)**

## **Dedicatória**

A Deus acima de tudo,  
Aos meus pais Margareth Avelino e  
Jonas dos Santos.  
Ao meu esposo José Edson e aos  
meus filhos Samara Gomes, Ana  
Sofia Gomes e Samuel Heitor

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todo amor e força que ele me proporcionou.

Aos meus pais Margareth Avelino, Pedro Barbosa e Jonas Souza, por todo amor, educação, força, apoio e compreensão ao longo de toda minha vida.

Ao meu esposo José Edson de Arruda Gomes que me compreendeu em todos os momentos de dificuldades e realizou o papel de mãe quando eu estive ausente.

Aos meus filhos Samara Gomes, Ana Sofia Gomes e Samuel Heitor por todo amor e compreensão na minha ausência.

Em especial ao Dr. Sérgio Albuquerque, meu orientador, pela paciência, apoio, acreditação, humildade e todos os ensinamentos sobre o amor pela ciência, que para mim transmitiu.

Em especial à Rechfy Kasem, Alexandre Terço, Janaina Santana, Edson Lira e a Carolina Fadul por toda sua dedicação e por ter estado ao meu lado neste trabalho quando mais tive dificuldade.

Em especial a Dra Aya Sadahiro e a Dra Adriana Malheiro pela compreensão e suporte durante o desenvolvimento do curso.

Em especial ao Dr. Nelson Fraiji e ao Dr. Rodrigo Leitão, pelo apoio e disponibilidade para realização das atividades.

Em especial aos colaboradores da farmácia Alexandre Felipe, Cristiana Novaes, Dilciane Ihara, Dione Gomes, Kastyellen Souto, Rosimar Pires, Tereza Jaqueline e Wanderlan Kuitzinger pelo apoio, compreensão e companheirismo durante os momentos de ausência do serviço e ainda pelo belo desempenho das atividades.

Aos amigos do laboratório, que também são minha família Lucianna Côrrea, Edalton

Sanguino, Nayane de Paula, Agda Blenda, Lya Emanoele, Diana Mota, Marcia Souza, Celiane Silva, Monique Antunes e Rafael Maciel por todo companheirismo e suporte.

Aos meus amigos de turma Cacilda Satomi Mallman, Nilberto Dias, Willian Fuzita, Walter Luiz, Suellen Nunes, Luciana Brito, André Corado, Cláudio Freitas, Yuri Chaves e Karem Balieiro por todos os momentos inesquecíveis que vivemos juntos nesta jornada.

Ào professor Dr. William Sérgio, por ter me orientado no estágio e docência e ter me proporcionado ampliação do conhecimento.

Ao enfermeiro Evilázio e a bibliotecária Julaide pelo apoio.

Aos colaboradores do laboratório de Imunohematologia

À Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À FAPEAM, pelo investimento de recursos.

À Universidade Federal do Amazonas, por esta formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada e a todos os seus integrantes, pela concretização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização deste sonho.

# Estudo da associação dos polimorfismos DUFFY com a severidade da doença falciforme

## RESUMO

**Introdução:** A doença falciforme apresenta um considerável espectro de desordens clínicas com o aumento de citocinas inflamatórias, principalmente IL-8, que pode exercer um papel na patogênese desta doença. A glicoproteína Duffy nos eritrócitos é responsável pela retirada da destas citocinas da circulação, porém indivíduos com polimorfismos  $Fy^{weak} (WK)$  ou  $Fy^{eritocyte\ silente} (ES)$ , podem ter uma menor eficácia nesta ação, o que pode estar associado com manifestações mais severas desta doença. **Objetivo:** Elaboramos este estudo com o objetivo de investigar a associação de polimorfismos *DUFFY* com a severidade da doença falciforme. **Materiais e Métodos:** Estudamos pacientes falciformes atendidos no Hemocentro do Amazonas, nos quais foram avaliados os achados clínicos e laboratoriais, sendo os mesmos agrupados conforme o grau de severidade. Realizamos fenotipagens e genotipagens do sistema Duffy, através das técnicas de gel centrifugação e PCR/RFLP respectivamente. A análise foi realizada através do pacote R Core Team (2012), R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **Resultado:** Foram estudados 120 pacientes, nos quais foram encontrados, quanto a manifestação da doença classificada 6 pacientes (5%) apresentaram grau 0, 42 (35%) grau 1, 53 (44.2%) grau 2, 17 (14,2%) grau 3 e 2 (1,6%) grau 4. Quanto ao grau de manifestação da doença falciforme quando associado com a genotipagem Duffy encontramos para  $FYA/FYB$  48 (40%) e para o  $FYB^{ES}/FYB^{ES}$  3 (2,5%). **Conclusão:** Diante dos resultados apresentados podemos inferir que os pacientes falciformes do estudo apresentam maior frequência para o genótipo  $FYA/FYB$ , e ainda estes pacientes estão mais associados com o uso de hidroxuriúria e com episódios de vaso-oclusão. Com isso, mais estudos, são necessários para esclarecer a associação dos polimorfismos Duffy com a doença falciforme.

**Palavras-chave:** Doença Falciforme, Genotipagem, Hemoglobina, Polimorfismo, Sistema Duffy



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
%	Porcentagem
°C	Graus centígrafos
µl	Microlitro
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
APS	Persulfato de amônia
Arg	Arginina
AVC	Acidente vascular cerebral
AVE	Acidente vascular encefálico
BCP	Broncopneumonia
Ban I	Enzima de restrição <i>BanI</i>
C	Citosina
CBC	Complete Blood Count
CHC	Conteúdo da hemoglobina celular
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CVO	Crise vaso-oclusiva
CXCL8	Interleucina IL-8
Cys	Cisteína
DARC	Duffy Antigen receptor for chemokines (Antígeno Duffy receptor para quimiocina)
DHL	Desidrogenase láctica
INTRON	Região que não codifica aminoácidos
EXON	Região codificadora de aminoácidos
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Água Destilada
dATP	Deoxi-adenina trifosfato
dCTP	Deoxi-citosina trifosfato
dGTP	Deoxi-guanina trifosfato
DNTP	Dideoxynucleotídeo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DHL	Desidrogenase láctica

<b>DNA ladder</b>	Marcador de peso molecular
<b>EDTA</b>	Ácido ethileno diamino tetra acético
<b>et al</b>	e outros
<b>Fy</b>	Simbolo Duffy no SITS
<b>FY*A</b>	Gene <i>FY*A</i>
<b>FY*A/FY*B</b>	Gene <i>FY*A/FY*B</i>
<b>FY*B</b>	Gene <i>FY*B</i>
<b>FY*B-33</b>	Gene <i>FY*B-33</i>
<b>FY*B<sup>fraco</sup></b>	Gene <i>FY*B<sup>fraco</sup></i>
<b>FY*X</b>	Gene <i>FY*X</i>
<b>FY*(ES)</b>	Gene <i>FY*<sup>eritrocyte silent</sup></i>
<b>FY (WK)</b>	Gene <i>FY*<sup>WEAK</sup></i>
<b>Fy3</b>	Antigeno Fy3
<b>Fy4</b>	Antigeno Fy4
<b>Fy5</b>	Antigeno Fy5
<b>Fy6</b>	Antigeno Fy6
<b>Fy<sup>a</sup></b>	Antigeno Fy <sup>a</sup>
<b>Fy<sup>b</sup></b>	Antigeno Fy <sup>b</sup>
<b>G</b>	Guanina
<b>GEL</b>	Técnica de hemaglutinação em gel
<b>Glu</b>	Ácido glutâmico
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GLD</b>	Glutamato desidrogenase
<b>GPD</b>	Glicoproteina Duffy
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbA</b>	Hemoglobina A
<b>Hb CS</b>	Hemoglobina S – talassemia $\beta^+$
<b>HbF</b>	Hemoglobina Fetal
<b>HbS</b>	Hemoglobina S
<b>HBSS</b>	Hemoglobina S (homozigose)
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>HCT</b>	Hematócritos
<b>HDW</b>	Largura de distribuição da concentração de hemoglobina

<b>HGB</b>	Concentração de hemoglobina
<b>HU</b>	Hidroxiuréia
<b>IgG</b>	Imunoglobulina classe G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina classe M
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KDa</b>	KiloDowton
<b>L</b>	Litro
<b>LISS</b>	Tampão de baixa força iônica
<b>M</b>	Molar
<b>MCHC</b>	Média da concentração corpuscular da hemoglobina
<b>MCP-1</b>	Proteína Quimiotática de Monócito
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MGSA</b>	Fator estimulador da atividade de melanócito
<b>MIP-1</b>	Proteína inflamadora de Macrófago 1
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b><i>MspAI</i></b>	Enzima de restrição <i>MspAI</i>
<b><i>Mwo</i></b>	Enzima de restrição <i>Mwo</i>
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>mM</b>	Milimol
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina de nucleotídeo
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>ON</b>	Osteonecrose
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PLT</b>	Contagem de plaqueta
<b>pmol</b>	Picomol
<b>PNG</b>	Papua Nova Guiné
<b>PCR/RFLP</b>	Polymerase Chain Reaction Fragment Lengt Polymorphism. Reação

	Polimerase - Análise de polimorfismo digestão enzimática Segmentos de
<b>PRIMERS</b>	Oligonucleotídeos sintéticos
<b>RANTES</b>	Células expressas e secretadas reguladas na ativação
<b>RDW</b>	Largura da distribuição de eritrócitos
<b>Rh</b>	Rhesus
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>SNP</b>	Polimorfismo de base única
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SITS</b>	Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue
<b>STA</b>	Síndrome torácica aguda
<b><i>StyI</i></b>	Enzima de restrição <i>StyI</i>
<b>T</b>	Timina
<b>TA</b>	Temperatura Ambiente
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>V</b>	Volt
<b>VAL</b>	Valina
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio
<b>VMP</b>	Volume médio de plaquetas

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da glicoproteína duffy	28
Figura 2: Fluxograma da abordagem e inclusão do paciente e doador no estudo	35
Figura 3: Gel de centrifugação para fenotipagem duffy (diamed)	37
Figura 4: Análise RFLP de produtos de PCR amplificados com oligonucleotídeos iniciadores <i>FYAB1/FYAB2</i> utilizando enzima de restrição <i>Ban I</i> após eletroforese em gel de agarose 1,5%	39
Figura 5: Análise por RFLP de produtos de PCR amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores <i>FYNI/FYN2</i> utilizando a enzima de restrição <i>SlyI</i> após eletroforese em gel de acrilamida a 12% para a detecção de mutação na posição -33 T>C do GATA box	40
Quadro 1: Escada de tratamento para dor	22
Quadro 2: Principais grupos de analgésicos, opióides e adjuvantes utilizados na doença falciforme	22
Quadro 3: Terminologia do sistema de grupo sanguíneo duffy - Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Expressão da glicoproteína nos diferentes fenótipos e genótipos	29
Tabela 2: Comparação da frequência da genotipagem Duffy entre pacientes falciformes e indivíduos saudáveis	42
Tabela 3: Manifestações da doença falciforme	43
Tabela 4: Associação da gravidade da doença falciforme com o Sistema Duffy	44
Tabela 5: A vaso-oclusão em pacientes falciformes	45
Tabela 6: A manifestação de AVC nos pacientes falciformes	45
Tabela 7: A manifestação de osteonecrose em pacientes falciformes	46
Tabela 8: Pacientes com disfunção renal	46
Tabela 9: Pacientes que apresentaram úlcera de perna	47
Tabela 10: Contagem de Células (Leucócitos)	48

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 Doença Falciforme.....	18
2.1.1 Doença Falciforme no Brasil.....	18
2.1.2 Doença Falciforme no Amazonas.....	18
2.1.2 Gene da Anemia Falciforme.....	19
2.1.3 Manifestações Clínicas da Doença Falciforme.....	19
2.1.4 Tratamento na Doença Falciforme.....	21
2.1.5 Mediadores inflamatórios e a anemia falciforme.....	23
2.1.5.1 Fatores que modulam a gravidade da doença falciforme.....	23
2.1.5.2 A CXCL8 relacionada com anemia falciforme.....	23
2.2 Sistema DUFFY.....	24
2.2.1 Glicoproteína DUFFY.....	27
2.3 Considerações Clínicas da Doença Falciforme Associada com os Polimorfismos do Sistema Duffy.....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 Área de Estudo.....	33
4.2 Indivíduos do Estudo.....	33
4.3 Critérios de Elegibilidade.....	33
4.4 Tamanho da amostra.....	33
4.4.1 Pacientes Falciformes.....	33
4.4.2 Indivíduos Saudáveis.....	34
4.5 Amostragem.....	34
4.6 Procedimento de Inclusão de Participantes no Estudo.....	34
4.7 Metodologia do estudo.....	35
4.8 Coleta de Dados.....	35
4.9 Dados Laboratoriais.....	36
4.10 Coleta das amostras.....	37
4.11 Processamento das amostras.....	37
4.12 Teste de Fenotipagem.....	37
4.13 Genotipagem do sistema sanguíneo Duffy.....	38
4.13.1 Extração de DNA genômico.....	38
4.13.2 Reação de Cadeia da Polimerase, do inglês Polimesare Chain Reaction (PCR).....	38
4.13.3 Genotipagem para GATA.....	39
4.14 Considerações Éticas.....	40
4.15 Métodos Estatísticos.....	40
<b>5. RESULTADOS</b> .....	42
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
APÊNDICE A.....	60
APÊNDICE B.....	61

APÊNDICE C.....	62
APÊNDICE D.....	63
APÊNDICE E.....	64
APÊNDICE F.....	66
ANEXO A.....	67
ANEXO B.....	69



## 1 INTRODUÇÃO

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM) é o centro de referência no Estado do Amazonas para acompanhamento de pacientes com diagnóstico de Doença Falciforme e atualmente atende, aproximadamente, 202 pacientes provindos tanto do interior quanto da capital Manaus. Na instituição, esses pacientes recebem atendimento médico especializado além do tratamento medicamentoso necessário para a manutenção da integridade física e controle da dor. No entanto, a maioria dos pacientes possui evolução clínica severa o que implica episódios de dor aguda resultante de crises vaso-oclusivas, desenvolvimento de doenças graves como o acidente vascular cerebral (AVC) e internações e terapia transfusional frequentes o que aumenta as taxas de morbimortalidade nesse grupo.

Os pacientes falciformes apresentam diversidade de manifestações clínicas e laboratoriais evidenciadas pela sintomatologia e pelos próprios resultados de exames sendo a característica gênica principal comum a todos. Desta forma, quais fatores poderiam estar dirigindo essas diferenças?

Com a evidência da atividade do sistema imunológico exercendo um papel importante na liberação de quimiocinas inflamatórias, que por sua vez estão relacionadas com alguns aspectos clínicos da doença falciforme como a vasclusão, dano tecidual e dor, questiona-se a possibilidade de que variáveis no sistema imunológico possam interferir no grau de severidade da doença. Dentre essas variáveis, elegemos a glicoproteína Duffy que desempenha a função de escoadouro de algumas quimiocinas como a interleucina 8 (IL-8), relacionada em alguns estudos como de importância em aspectos clínicos na doença falciforme. Além disso, polimorfismos na proteína Duffy podem estar associados ao nível de clearance da IL-8 como observado nas diferentes manifestações clínicas e laboratoriais em pacientes falciformes, como por exemplo, na contagem de leucócitos e nos danos em órgãos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Doença Falciforme

As hemoglobinopatias, resultantes de alterações na molécula de hemoglobina que afeta a sua estrutura ou síntese, constituem uma das principais e mais frequentes doenças genéticas que acometem os seres humanos e dentre elas, destaca-se a doença falciforme devido a sua alta prevalência em todo o mundo (estudos sugerem que 250.000 crianças com doença falciforme nascem a cada ano) (BRASIL, 2012a; SILLA, 1999).

Descrita pela primeira vez em 1910 por Herrick (GÓMEZ-CHIARI; PUIGBERT; ARAMBURU, 2003; INÍGUEZ et al, 2003), a doença falciforme é uma desordem genética que engloba um grupo de anemias e é caracterizada por uma alteração estrutural na cadeia betaglobina originando hemoglobinas anormais sendo as mais comuns a hemoglobina S (HbS) que ocasiona a anemia falciforme quando em homozigose (HbSS) e a hemoglobina C (HbC) que resulta na dupla heterozigose SC ou homozigose CC (WHO, 1985).

#### 2.1.1 Doença Falciforme no Brasil

De origem africana, a doença falciforme foi trazida para as Américas através da migração de escravos e atualmente é encontrada em toda Europa e Ásia (BRASIL, 2001). Constitui a enfermidade monogênica mais comum no Brasil, por sua relevante presença na população. Atualmente, no Brasil, nascem cerca de 3.500 crianças por ano com Doença Falciforme ou 1/1.000 nascidos vivos e 200 mil portadores do traço falciforme. Tal doença encontra-se distribuída na população de forma heterogênea devido à miscigenação da população, tendo maior prevalência nos estados da região sudeste e nordeste que possuem maior concentração de afrodescendentes com recorte social entre os mais pobres (BRASIL, 2012b).

#### 2.1.2 Doença Falciforme no Amazonas

No Amazonas, aproximadamente 202 pacientes estão cadastrados no programa de hemoglobinopatias do Ministério da Saúde onde recebem ou já receberam algum atendimento na FHEMOAM a qual dispõe de acompanhamento clínico especializado, serviço de urgência e ainda, suporte terapêutico necessário para o tratamento.

### 2.1.2 Gene da Anemia Falciforme

O gene falciforme ocorre com uma mutação pontual que causa a substituição do aminoácido ácido glutâmico na sexta posição da cadeia da b globina (b6) para valina (b6Glu-Val), desta forma, a hemoglobina S é representada por  $\alpha_2/\beta^S_2$  6Glu-Val. Essa substituição é devida à alteração na segunda base do códon que codifica o ácido glutâmico, ou seja, GAG para GTG ocasionando o surgimento de uma hemoglobina patológica que apresenta modificações na estrutura molecular. (GAY et al, 1997; COTRAN et al, 1994 e BUNN et al, 1986).

A hemoglobina alterada passa a apresentar propriedades físico-químicas diferenciadas, bem como alteração na estabilidade e solubilidade propiciando um estado favorável para o processo de polimerização, o que irá resultar em um processo de deformação e enrijecimento da membrana da hemácia quando exposta a situação de baixa tensão de oxigênio ocasionando na transformação do eritrócito que passa a apresentar forma de foice (NETO, 2003).

O processo de polimerização da célula depende basicamente de três níveis variáveis, como de desoxigenação, concentração da hemoglobina S e a presença da hemoglobina F. A desidratação celular ocorre como consequência das percas de íons potássio e de água, e a mudança na conformação da hemácia resulta na perca da capacidade de circulação da célula nos capilares. Fatores como perda de elasticidade, aumento da viscosidade, polimerização e rigidez da membrana quando associados à adesão do eritrócito em forma de foice no endotélio desencadeiam a formação de trombos na circulação.

### 2.1.3 Manifestações Clínicas da Doença Falciforme

São diversas as manifestações clínicas apresentadas por pacientes portadores de doença falciforme os quais apresentam desde quadros assintomáticos a quadros acentuadamente graves que ocorrem a partir do primeiro ano e estende-se por toda a vida (ZAGO; PINTO, 2007). Os indivíduos portadores da anemia falciforme (HbSS) possuem manifestações clínicas mais graves em comparação com portadores de outras hemoglobinas anormais associadas ou não a HbS (COSTA, 2001).

O diagnóstico da doença falciforme é realizado de forma precoce, na primeira semana de vida, pelos Serviços de Referência em Triagem Neonatal implantados pelo Ministério da Saúde visando à diminuição das taxas de mortalidade e a tomada de medidas de suporte e/ou profiláticas (BRASIL, 2013). A detecção da doença é feita por métodos diagnósticos de

biologia molecular como a eletroforese de hemoglobina, focalização isoelétrica ou cromatografia líquida de alta performance. (HPLC) (BEUTLER, 1995).

As complicações mais frequentes da doença falciforme e comumente as primeiras são as crises dolorosas que são causadas por episódios de vaso-oclusão (CVO) os quais obstruem o fluxo sanguíneo pelas hemácias falcizadas resultando em dano tissular isquêmico (BRASIL, 2013). Os episódios de CVO tem início pela aderência dos reticulócitos falciformes no endotélio resultando na formação de um ninho que captura as células falciformes rígidas facilitando a polimerização provocando dores localizadas e intensas podendo afetar qualquer tecido especialmente os ossos, tórax e abdômen (EMBURY, 1997; ZAGO, 2007).

As crises Aplásticas e Megaloblástica ocorrem em situações de quedas repentinas nos níveis de hemoglobinas, contagem de reticulócitos e precursores de reticulócitos. Eventos como a necrose da medula óssea podem desencadear febre, dor óssea, reticulocitopenia, resposta leucoeritoblástica provocando uma crise aplásica (BEUTLER, 1995).

A Crise de Sequestração é caracterizada pela retenção de eritrócitos especialmente no baço, sendo a sequestração esplênica aguda caracterizada por um evento exacerbado de anemia, reticulocitose, hipersensibilidade e hipertrofia do baço. Pacientes que não apresentam fibrose e conseqüente atrofia, estão sujeitos a alto risco, tanto pacientes jovens com anemia falciforme quanto adultos com doença de Hb CS ou anemia falciforme- talassemia  $\beta^+$  (SOLANKI; KLETTER; CASTRO, 1986).

A Crise hemolítica é ocasionada devido à oclusão microvascular, seguido de adesão de eritrócitos e leucócitos no endotélio. As hemácias em forma de foice são formadas devido a diminuição da oxigenação tecidual reduzindo assim, o tempo de vida das hemácias para 20 dias, sendo então retiradas da circulação pelo baço ocasionando uma anemia hemolítica crônica, alterando assim a função do organismo a fim de manter a homeostase (BRASIL, 2012).

A Crise álgica pode ser aguda, subaguda ou crônica podendo ou não estar acompanhada de febre, edema e calor na área afetada, acomete principalmente os ossos como tíbia, fêmur e úmero, sendo que o infarto ósseo pode ocorrer em qualquer local. Em locais como joelhos e cotovelos, o infarto pode ser confundido com artrite séptica e, nos demais ossos com osteomielite. Em pacientes do sexo feminino há um aumento de crises próximo do período menstrual, o que pode ser atenuado com o uso de contraceptivos de uso contínuo, para induzir a amenorreia (YOONG; TUCK, 2002).

Entre as principais manifestações clínicas estão osteonecrose, úlcera de membros inferiores, disfunção renal, acidente vascular encefálico (AVC) e alteração no número de

leucócitos entre outros (BRAGA, 2007; PRYOR et al., 2004; STUART; NAGEL, 2004).

O acidente vascular cerebral (AVC) ocorre principalmente na infância até os vinte anos de idade (OHENE & WEINER, 1998) e deve ser considerado como manifestação grave por causa da morbimortalidade associada (ÂNGULO, 2007). As manifestações neurológicas geralmente são focais e podem incluir hemiparesia, hemianestesia, deficiência do campo visual, afasia e paralisia de nervos cranianos (BRASIL, 2013).

Síndrome torácica aguda (STA) é uma das causas de internação hospitalar que acomete cerca de 40% de jovens adultos com anemia falciforme e tem como característica um infiltrado pulmonar em conjuntos com problemas respiratórios e febre (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010)

Osteonecrose (ON) é caracterizada por infarto e necrose nas superfícies articulares e cabeça de ossos longos na ausência de fatores responsáveis como tumor, traumatismo e osteomelite (EBONG, 1980; NEBOR et al., 2010)

Priapismo é marcado por uma ereção peniana prolongada e dolorosa, classificada em dois estágios baixo fluxo (isquêmico) e alto fluxo (não isquêmico) (KEOGHANE; SULLIVAN; MILLER, 2002). Em quadro de anemia falciforme (AF) é comum encontrar o de baixo fluxo, com quadro agudo ou recorrente que ocorre normalmente a noite e acomete cerca de 30% a 45% dos pacientes (ROGERS, 2005; VICARI, 2007).

A elevação da pressão da artéria pulmonar (PAP) está diretamente associada ao risco elevado de mortes em pacientes adultos (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Úlceras de membros inferiores (UMI) são frequentes em adultos, são formadas a partir das obstruções causadas pela hemácias falcizadas, infecções bacterianas, anemia com diminuição de oxigênio, trombose e diminuição de óxido nítrico (NO) são os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento das úlceras (MINNITI et al., 2010).

Outras complicações do sistema nervoso central (SNC) podem ocorrer como: convulsões, encefalopatias, hipertensão intracraniana, meningite, alterações mentais, neuropatia periférica e hipertensão intracraniana por oclusão venosa (ANGULO, 2007).

Quadros de anemia é frequente nos doentes falcêmicos, o que pode apresentar um estágio crônico apresentando níveis de hemoglobina variantes de 6,0 e 11,0 g/dl e hemácias com vida reduzida de 120 dias para 10 a 12 dias (VAN-DÚNEM, 2004).

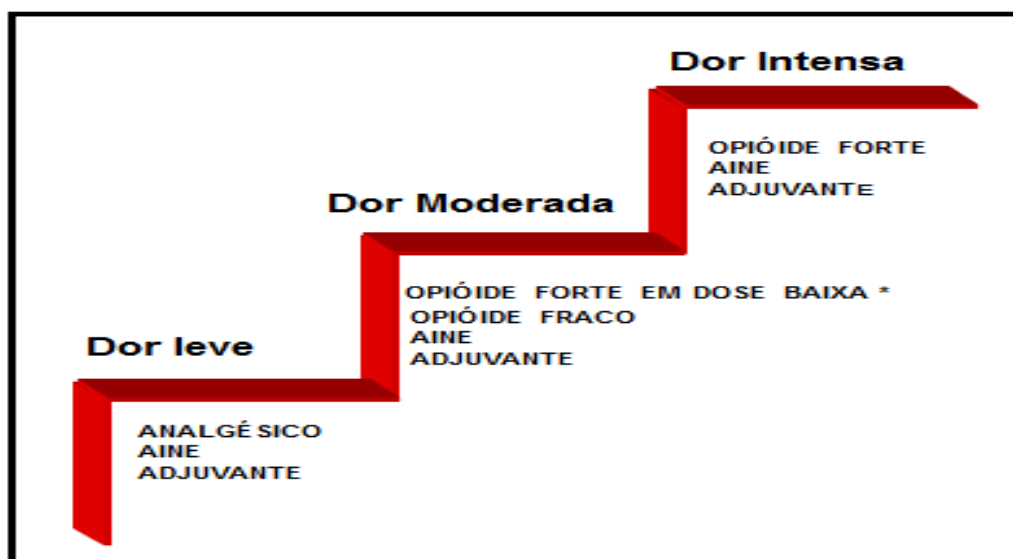
#### 2.1.4 Tratamento na Doença Falciforme

Os principais tratamentos na anemia falciforme são as tomadas de medidas

preventivas, a fim de amenizar as anemias crônicas, as crises de falcização e dos riscos a quadros de infecção. Para um bom tratamento é necessário que o paciente receba uma boa nutrição, hidratação adequada, diagnóstico precoce e acompanhamento clínico com esclarecimentos sobre a doença para pacientes e familiares e ainda a realização de exames periodicamente (BRAGA, 2007)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propõe a utilização de analgésicos através de uma escada de três degraus, conforme demonstrado no Quadro 1:

Quadro 1- Escada de tratamento para dor



Fonte: Katiane Gomes, 2104

A utilização de analgésicos opióides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) é necessária frequentemente em pacientes com doença falciforme com dores do tipo somático e visceral. A dor tende a responder bem ao tratamento com antiinflamatório e opióide.

Quadro 2- Principais grupos de analgésicos, opióides e adjuvantes utilizados na df

Analgésicos não opióide	AINES	Opióides fracos	Opióides potentes	Adjuvantes
Dipirona Acetaminofen AAS Paracetamol	AAS Diclofenaco Indometacina Ibuprofeno	Codeína Cloridrato de tramadol	Morfina Fentanila Petdina Nalbufina Metadona Oxicodona	Anticonvulsivante Antidepressivo Neuroléptico Benzodiazepínico Anticolinérgico

Como opção terapêutica utiliza-se o Hidroxiuréia que age diretamente nos mecanismos fisiopatológicos da AF contribuindo para o aumento da hemoglobina, diminuição de aderência dos eritrócitos e principalmente na diminuição dos fenômenos inflamatórios e vasoclusivos, proporcionando uma melhora na qualidade de vida do paciente (CANÇADO; LOBO; ANGULO, 2009; FIGUEIREDO, 2007; LANARO et al., 2009; OKPALA, 2005)

A terapia transfusional tem sido muito utilizada a fim de controlar as crises de sequestro e aplástica com o uso de concentrados de hemácias simples. Em casos de AVE agudo, síndrome torácica aguda, priapismo e pré-operatório utiliza-se método de substituição da massa circulante, obedecendo os critérios específicos para a indicação de transfusão no tratamento de complicações anêmicas severas (BRASIL, 2012a).

## 2.1.5 Mediadores inflamatórios e a doença falciforme

### 2.1.5.1 Fatores que modulam a gravidade da doença falciforme

Algumas características genéticas têm grande importância na gravidade clínica da doença, porque determinam a concentração intracelular de HbS. A elevada concentração de HbS é essencial para que a polimerização da HbS se inicie e se propague rapidamente, provocando a falcização e os fenômenos celulares que desencadeiam as lesões tissulares. Assim, genótipos que produzem uma menor concentração de HbS ou uma elevação de HbF (que não interage com as moléculas de HbS) dificultam a polimerização e a falcização, reduzindo a gravidade e intensidade das manifestações clínicas (ZAGO; PINTO, 2007).

### 2.1.5.2 A CXCL8 relacionada com anemia falciforme

O processo inflamatório crônico em pacientes falciformes se dá pela obstrução e lesão do endotélio vascular e ainda dos tecidos, ocasionando alterações significativas na produção das citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, estimulando a adesão leucocitária às células endoteliais. A CXCL8 é ativamente secretada pelas células endoteliais nos locais de inflamação; provocando a modificação na conformação das moléculas de integrina na superfície do neutrófilo, promovendo sua ligação com as moléculas receptoras na superfície das células endoteliais, ICAM-1. A CXCL8 expande a capacidade do neutrófilo de lisar bactérias pela intensificação da fagocitose, geração de superóxido e liberação de grânulos

(COSTA, 2004). Além disso, a CXCL8 promove a firme adesão do neutrófilo à célula endotelial, promove sua migração para os tecidos e ativando o seu mecanismo efetor. Estudos relatam, que a estimulação dos neutrófilos com IL-8 (10ng/mL) aumentam a expressão de Mac-1 em neutrófilos de pacientes com AF, apontando que este pode ser uma possível causa para o aumento da adesão observado nessas células. Recentemente, um estudo em pacientes falciformes constatou um aumento significativo dos níveis de CXCL8 (5-60 pg/mL) no plasma desses pacientes.

## 2.2 Sistema DUFFY

Historicamente, o gene Duffy foi o primeiro grupo sanguíneo cujo locus genético foi referido a um autossomo específico, o cromossomo 1, localizado próximo à região centromérica (DONAHUE et al., 1968).

Inicialmente o locus *FY* foi localizado na região 1q21-25 por análise de ligação. Posteriormente, o cDNA correspondente ao mRNA da proteína Duffy foi clonado a partir uma biblioteca de medula óssea e sequenciada (CHAUDHURI et al., 1993) e seu gene foi mapeado em 1q22-q23. (MATHEW et al., 1994). Acreditava-se que esse gene consistia de apenas 1 exon, revelando uma estrutura primária de um polipeptídeo altamente hidrofóbico, contendo uma sequência nonapeptídica N-terminal (MASSGYVLQ) composta de 338 aminoácidos chamado de transcrito menor (CHAUDHURI et al., 1995; NEOTE et al., 1994).

Um longo estudo subsequente revelou a presença de outro exon que contém sequências codificadoras não traduzidas. Esse exon pode ser unido (após splicing) ao segundo exon (exon 2) para dar origem a um transcrito de 336 aminoácidos, contendo uma sequência de um heptapeptídeo N-terminal (MGNCLHR) chamado de transcrito maior (IWAMOTO et al., 1996). Iwamoto, nesse estudo, determinou os níveis relativos da expressão dos dois *FY* mRNAs distintos verificando uma predominância do transcrito maior nas células eritróides e em todos os órgãos estudados.

Desde a descoberta, em 1995, por Iwamoto e colaboradores, que o gene *FY* é constituído de dois exons, sendo os nucleotídeos numerados utilizando o mRNA spliced. Assim, o primeiro nucleotídeo do códon de iniciação da tradução (AUG) é o nucleotídeo nº1 (POGO et al., 2000), numerando-se dessa forma e evitando as inconsistências criadas por diferentes tamanhos de 5'-UT aos diferentes sítios de iniciação da transcrição, sendo em nível proteico, a metionina numerada como nº 1 (IWAMOTO et al., 1996; TOURNAMILLE et al., 1995a).



O sistema Duffy consiste de quatro alelos, sendo eles *FYA*, *FYB*, *FY0* e *FYB* fraco quatro fenótipos: Fy(a+b+), Fy(a- b+), Fy(a+b-), e Fy(a-b-) e seis antígenos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy<sup>3</sup>, Fy<sup>4</sup>, Fy<sup>5</sup> e Fy<sup>6</sup> (POGO; CHAUDHURI, 2000).

Quadro 3- Terminologia do sistema de grupo sanguíneo Duffy - Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea

Sistema Duffy		Antígenos					
		Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Fy <sup>3</sup>	Fy <sup>4</sup>	Fy <sup>5</sup>	Fy <sup>6</sup>
Símbolo	FY	FY1	FY2	FY3	FY4	FY5	FY6
Número	008	008001	008002	008003	008004	008005	008006

Os antígenos Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> são codificados por duas formas alélicas do gene *FY*. Os alelos *FYA* e *FYB* diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125, onde no alelo *FYA*, a base é guanina (G) e no alelo *FYB* a base é adenina (A), produzindo um códon, no alelo *FYA*, para glicina (aminoácido 42 da sequência proteica), e um códon para o ácido aspártico, no alelo *FYB*. Essa substituição de um aminoácido no domínio amino terminal da proteína é suficiente para definir os dois antígenos. Essa variação leva à identificação dos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+) (CHAUDURI et al., 1995a); MALLINSON et al., 1995; TOURNAMILLE et al., 1995b)

Então, depois deste conhecimento, nenhum polimorfismo adicional havia sido encontrado no alelo *FY\*B*, sugerindo assim que os africanos não possuíam importante interrupção no Duffy ORF (Open Reading Frame) (CHAUDHURI et al., 1995b; TOURNAMILLE et al., 1995). Tournamille et al, 1995b descobriram um SNP na posição (-33) do início da transcrição primária no promotor do gene *Duffy* (inicialmente posicionado no nucleótido -46), sendo este a troca de um T por um C, resultando em um alelo *FY\*B<sup>ES</sup>*.

Africanos Duffy negativo eram homozigotos para o polimorfismo em um tecido específico no fator de transcrição GATA1. Ensaios *in vitro* mostraram que este polimorfismo bloqueava a expressão gênica em células de linhagem eritróide, mas não bloqueava a expressão em células não eritróides. Os resultados deste estudo forneceram a explicação molecular para a negatividade para Duffy no eritrócito (TOURNAMILLE et al., 1995b).

Desde a identificação dos SNPs que definiram Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup> e Duffy negativo, variantes adicionais menos comuns têm sido identificados para fornecer uma descrição mais completa do genótipo Duffy, assim como fenótipos sorológicos polimórficos. Após a identificação do alelo *FY\*B<sup>ES</sup>*, Zimmerman et al, em 1999 procuraram determinar se o gene *Duffy* em

habitantes de Papua Nova Guiné, vivendo em regiões endêmicas para *Plasmodium vivax*, seria caracterizado pelo acúmulo de qualquer polimorfismo funcional.

Um levantamento dos polimorfismos do promotor do gene Duffy e ORF previamente identificados, revelou que o mesmo SNP no promotor encontrado em Africanos (alelo  $FY*B^{ES}$ ) foi observado nos habitantes de Papua Nova Guiné (PPG) no alelo  $FY*A$  (sugerindo  $FY*A^{ES}$ ) (ZIMMERMAN et al., 1999).

Citometria de fluxo mostrou que comparando anti-Fy6 (NICHOLS et al., 1987) ligando o anticorpo à eritrócitos de seis indivíduos homozigóticos do tipo selvagem de PNG e seis indivíduos heterozigotos também de Papua Nova Guiné, mostrou que os indivíduos com dois alelos funcionais eritróide expressam aproximadamente duas vezes mais a quantidade de antígenos  $Fy^a$  quando comparado à indivíduos com apenas um alelo eritróide-funcional. Desde o momento em que o  $FY*A^{ES}$  foi descrito em Papua Nova Guiné, esse alelo foi encontrado também na Tunísia.

Antes de descrever polimorfismos adicionais, o fenótipo Duffy-negativo tem sido observado em associação com uma deleção de 14 nucleótidos na sequência de codificação de Duffy (MALLINSON et al., 1995). Outras variações sorológicas no Duffy, originalmente descrita por Chown; Lewis; Kaita (1965) foram observadas como resultado dos baixos níveis de expressão de  $Fy^b$  (denominado  $Fy^x$ ), observado primariamente em famílias caucasianas.

Novamente, a utilização de estratégias moleculares permitiu a identificação de trocas em sequências de nucleotídeos associadas com este fenótipo sorológico. Primeiro, as descrições da mutação codificando a variante  $Fy^x$ , ou  $Fy^{bweak}$ , identificaram polimorfismo no códon 89 do alelo  $FY*B$ , trocando na sequência de amino ácidos uma arginina (códon CGC) por uma cisteína (códon TGC) nos antígenos  $Fy^b$  e  $Fy^{bweak}$  (OLSSON et al., 1998; PARASOL et al., 1998; TOURNAMILLE et al., 1998). Este polimorfismo foi observado em associação com uma substituição do aminoácido alanina por uma treonina no códon 100 (GCA TCA) e uma adicional substituição de uma alanina por uma serina no códon 49 (GCA TCA) (CASTILHO et al., 2004).

A substituição nestes alelos  $FY*X$ , que todos compartilham, é arginina para cisteína no códon 89. Até o momento, este polimorfismo não foi observado no alelo  $FY*A$ . O polimorfismo  $Fy^x$  ocorre dentro do primeiro anel intracelular da proteína Duffy e está associada com a expressão de superfície celular reduzida de Duffy (OLSSON et al., 1998; TOURNAMILLE et al., 1998). A frequência do alelo  $FY*B^{weak}$  é aproximadamente 2% em caucasianos (CHOWN; LEWIS; KAITA, 1965). Finalmente, a fraca expressão de  $Fy^b$  tem sido descrita em associação com a deleção de um resíduo de nucleotídeo 'C' entre as posições

-76 e -74, do gene promotor do Duffy em um site Sp1 regulatório (OLSSON et al., 1998).

No geral, os estudos de citometria de fluxo testando a associação entre promotor Duffy e polimorfismos  $Fy^{bweak}$  demonstraram relações consistentes. Níveis relativos de expressão eritróide têm demonstrado que os portadores heterozigóticos de um alelo Duffy negativo expressam aproximadamente 50% do nível de antígenos Duffy nos seus eritrócitos comparando com os eritrócitos de indivíduos homozigóticos para alelos Duffy-positivos. O alelo  $FY*X$  está associado com aproximadamente 10% da expressão em comparação com os alelos  $FY*A$  e  $FY*B$ . (TOURNAMILLE et al., 1998).

O fenótipo Duffy global é dependente de SNPs tanto do promotor como da região de codificação. A expressão de fenótipos está relacionada aos 15 diferentes genótipos possíveis dos cinco alelos Duffy conhecidos ( $FY*A$ ,  $FY*B$ ,  $FY*X$ ,  $FY*A^{ES}$ ,  $FY*B^{ES}$ ) (PARASOL et al., 1998).

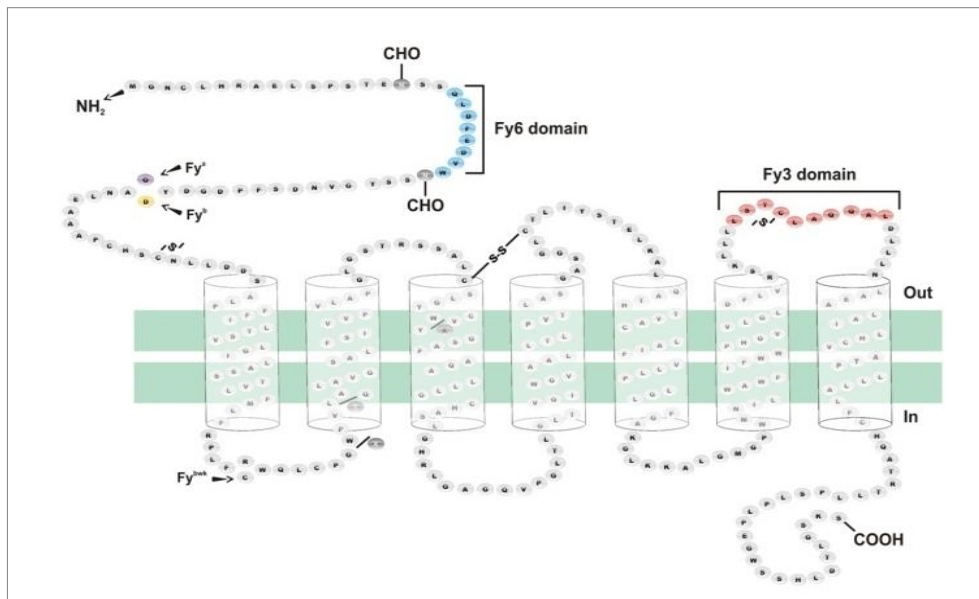
Parasol et al (1998) descreveram uma nova mutação presente na sequência do código do gene  $FY*B$  (271C>T), que está associada com alguns fenótipos Fy(b-) entre os judeus de grupo não Ashkenazi e negros brasileiros. A mutação está presente em indivíduos Fy(b-) que apresentam a sequência GATA normal associada à outra mutação no gene  $FYB$  (304 G>A). A substituição 271 C>T, representa uma mudança considerável na estrutura química da molécula (Arg91>Cys), a qual pode afetar os determinantes antigênicos do sistema Duffy, assim como, sua significância clínica. Esta mutação pode ter implicações em alguns papéis fisiológicos do sistema Duffy e ser de interesse na pesquisa de malária e em estudos genéticos populacionais.

### 2.2.1 Glicoproteína DUFFY

Os determinantes antigênicos residem em uma glicoproteína ácida (gp-DARC ou gp-FY), que atravessa a membrana sete vezes e tem um domínio N-terminal exocelular e um domínio C-terminal endocelular (POGO; CHAUDHURI, 2000).

A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não eritróides como o rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cerebelo (CHAUDHURI et al., 1995; HADLEY; PEIPER, 1997; HESSELGESSER; HORUK, 1999) .As células responsáveis pela expressão de Duffy nesses tecidos, são as células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares, exceto no cérebro, onde a expressão Duffy está localizada nas células de Purkinje (HADLEY et al., 1994; NEOTE et al., 1993; PEIPER et al., 1995).

Figura 1-Representação da glicoproteína duffy



Fonte: Adaptada de Tournamille et al, 2003. A figura mostra a estrutura de DARC que é constituído por uma região extracelular amino terminal (extracelular amino-terminal 1, ECD1), uma região central (~250 resíduos) constituída por sete domínios transmembranar, três alças extracelulares (ECD2 a ECD4) e três alças intracelulares; e uma região citoplasmática de 28 resíduos.

Indivíduos Duffy negativo Fy(a-b-) não possuem a proteína Duffy, na membrana das hemácias, sendo este fenótipo predominantemente encontrados em africanos e americanos negros. Em alguns casos de indivíduos Fy (a-b-) não negros, uma mutação “nonsense” evita a síntese da gp-Fy. Nas hemácias Fy (a-b(+)), o antígeno Fyb é fracamente expresso devido a uma reduzida quantidade de proteína (POGO; CHAUDHURI, 2000).

Na tabela 01, é demonstrada a variação na expressão dos antígenos Duffy de acordo com a combinação alélica no genótipo *DUFFY* (*FYA*, *FYB*, *FYBW*, *FYAES*, *FYBES*), o que pode estar diretamente relacionado à expressão da gpFy.

Tabela 1: Expressão da glicoproteína nos diferentes fenótipos e genótipos

Alelos	Antígeno	Genótipo	Fenótipos	
			Fenotipagem	Expressão
<i>FYA</i>	Fy <sup>a</sup>	<i>FYA/FYA</i>	Fy (a+ b-)	2×Fya, 0×Fyb
<i>FYB</i>	Fy <sup>b</sup>	<i>FYA/FYA<sup>ES</sup></i>	–	1×Fya, 0×Fyb
<i>FYX</i>	Fy <sup>bweak</sup>	<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	–	1×Fya, 0×Fyb
<i>FYA<sup>ES</sup></i>	–	<i>FYB/FYB</i>	Fy (a- b+)	0×Fya, 2×Fyb
<i>FYB<sup>ES</sup></i>	–	<i>FYB/FYB<sup>X</sup></i>	–	0×Fya, 1,1×Fyb
–	–	<i>FYB/FYA<sup>ES</sup></i>	–	0×Fya, 1×Fyb
–	–	<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	–	0×Fya, 1×Fyb
–	–	<i>FYB<sup>W</sup>/FYB<sup>W</sup></i>	Fy (a- (b+ fraco))	0×Fya, 0,2×Fyb
–	–	<i>FYB<sup>X</sup>/FYA<sup>ES</sup></i>	–	0×Fya, 0,1×Fyb
–	–	<i>FYB<sup>X</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	–	0×Fya, 0,1×Fyb
–	–	<i>FYA/FYB</i>	Fy (a+ b+)	1×Fya, 1×Fyb
–	–	<i>FYA/FYB<sup>X</sup></i>	–	1×Fya, 0,1×Fyb
–	–	<i>FYA<sup>ES</sup>/FYA<sup>ES</sup></i>	Fy (a- b-)	0×Fya, 0×Fyb
–	–	<i>FYA<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	–	0×Fya, 0×Fyb
–	–	<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	–	0×Fya, 0×Fyb

Fonte: Zimmerman, 2013.

Horuk et al. (1993) mostraram em um estudo sobre receptores de quimiocinas multiespecíficos em eritrócitos humanos, que a IL-8, liga-se minimamente a eritrócitos Duffy negativos. Neste estudo, os anticorpos monoclonais para antígenos Duffy bloqueavam a ligação de IL-8 em eritrócitos Duffy positivo, e também a IL-8 impedia a ligação e a invasão por *Plasmodium knowlesi* em hemácias, levando a diversas linhas de evidências, indicando que os antígenos de grupo sanguíneo Duffy são receptores de quimiocinas.

Foi visto também que a organização dos dois exons *FY* é a mesma encontrada nos genes de outros receptores de quimiocinas. A partir de então, o gene que codifica os antígenos eritrocitários do sistema Duffy foram também denominados DARC (Duffy Antigen Receptor Chemokines) (CHAUDHURIF et al., 1994; MURPHY, 1994; NEOTE et al., 1994).

O significado biológico do DARC nos eritrócitos, inicialmente pareceu questionável, devido à falta de associação entre doenças e fenótipo Duffy negativo (POGO; CHAUDHURI, 2000). Porém, a relação função-estrutura e a localização do DARC na fisiologia normal e patológica ainda permanecem um campo vasto para novas descobertas.

A diminuição da função renal após transplante está mais associada à pacientes com fenótipo Fy (a-b-), podendo ser devido à ausência de receptores DARC, que faz o papel de atenuante dos efeitos inflamatórios, agindo como um escoadouro de quimiocinas (AKALIN; NEYLAN, 2003);

### 2.3 Considerações Clínicas da Doença Falciforme Associada com os Polimorfismos do Sistema Duffy

O sistema de grupos sanguíneo Duffy é considerado de grande importância na terapia transfusional, para os pacientes que dela necessitam. Com frequência recomenda-se a utilização de bolsas de concentrados de hemácias previamente fenotipadas para os principais sistemas de grupo sanguíneos, sendo eles o ABO, Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS afim de evitar alo imunizações (QUIROLO, 2010; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). É comum a alo imunização em pacientes falciformes, devido a grande necessidade de transfusões e as diferenças étnicas entre receptores e doadores de sangue.

Sabe-se que a glicoproteína DARC quando expressada nos eritrócitos atua como receptor de quimiocinas, promovendo o clearance de citocinas, entre elas IL-8, MCP-1 e RANTES.

A doença falciforme é uma característica dos afrodescendentes, sendo eles um dos principais grupos de pessoas a apresentarem os fenótipos negativos para Fy (a-,b-), com a ausência da expressão desses fenótipos nas hemácias. Acredita-se que ocorrerá um aumento nos níveis séricos dessas citocinas promovendo uma resposta inflamatória exacerbada, contribuindo para um quadro acentuado de sintomas produzidos por doentes falciformes (AFENYI-ANNAN et al., 2008).

Portanto apesar de observarmos estudos que indicam que indivíduos com polimorfismos resultando em fenótipos Fy<sup>weak</sup> (WK) ou Fy<sup>eritocyte silente</sup> (ES), com reduzida expressão da proteína, podem ser menos eficientes na retirada de citocinas inflamatórias. Existem estudos com resultados controversos, como o caso de Araújo e bezerra (2011), que não encontraram associações entre os genótipos Duffy e manifestações clínicas na doença falciforme analisada em 137 crianças. Neste estudo foram realizadas análises focadas na revisão de prontuários considerando os seguintes parâmetros: uso de hidroxiuréia; episódios de asma, dactilite, sequestro esplênico, broncopneumonia (BCP), acidente vascular cerebral (AVC), assim como inclusão ou não no grupo de faixa de risco para AVC; frequências de crises vasclusivas (CVO), internamentos e transfusões sanguíneas; média da hemoglobina total, reticulócitos, lactato desidrogenase (DHL) e níveis de bilirrubinas total e indireta.

O estudo de Afenyi-Annan et al., (2008) concluiu que há associações entre os genótipos Duffy e a doença falciforme. Neste estudo foram analisados 237 pacientes e foram encontradas associações, quanto à contagem de células brancas em pacientes Fy+ em relação aos Fy- (p=0,03); o uso de Hidroxiuréia foi maior em pacientes Fy+ (p<0.001); e observou-se

que os Fy- estavam mais propensos a apresentarem quadros de proteinúria ( $p=0.0002$ ) e ainda uma forte associação do fenótipo Fy- com os pacientes que apresentaram lesão de órgãos.

Diante do exposto acima se observa que a eleição de um biomarcador, que possa indicar o grau de severidade da anemia falciforme, é de grande valia para o tratamento destes pacientes. portanto elaboramos a seguinte pergunta científica: em pacientes do estado do Amazonas, portadores de anemia falciforme, os polimorfismos *Duffy*, estão associados com a severidade da doença?

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar as associações entre os polimorfismos *DUFFY* e a severidade na doença falciforme.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

3.2.1 Identificar os polimorfismos *DUFFY* encontrados nos pacientes com doença falciforme conforme o grau de severidade;

3.2.2 Descrever os polimorfismos Duffy relacionados às manifestações clínicas da doença falciforme;

3.3.3 Comparar a prevalência dos polimorfismos *DUFFY* entre pacientes falciformes e indivíduos saudáveis do Estado do Amazonas.



## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Área de Estudo**

Cidade de Manaus.

### **4.2 Indivíduos do Estudo**

- a) Pacientes portadores de Doença Falciforme atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas - HEMOAM.
- b) Indivíduos saudáveis - doadores de sangue.

### **4.3 Critérios de Elegibilidade**

#### **4.3.1 Inclusão**

Paciente portador de doença falciforme de qualquer idade, gênero e ancestralidade, com diferentes graus de severidade da doença falciforme que não possuam relatos de infecções que possam influenciar nos achados laboratoriais e clínicos.

Indivíduos saudáveis candidatos à doação de sangue, apto na triagem clínica, hematológica e sorológica.

#### **4.3.2 Exclusão**

Pacientes cuja amostra de sangue foi considerada inadequada para a realização dos testes e não foi possível realizar nova coleta.

### **4.4 Tamanho da amostra**

#### **4.4.1 Pacientes Falciformes**

Foram estudados 120 indivíduos portadores de doenças falciformes, a Fundação Hemoam é o centro tratador de referência para o tratamento da doença, contudo a dificuldade

de acesso é grande para os pacientes que residem no interior do Estado, que só procuram o serviço em caso de emergência ou quando da necessidade da terapia medicamentosa, descobriu-se que há muitos casos de pacientes detectados no serviço, mas que não residem no Estado do Amazonas.

#### 4.4.2 Indivíduos Saudáveis

Utilizamos uma amostra de 247 indivíduos saudáveis que serviram como grupo comparativo para a prevalência dos polimorfismos *DUFFY*. O grupo controle servirá como base para análise da frequência do sistema Duffy em pessoas saudáveis a fim de identificarmos se os resultados obtidos dos pacientes são característicos deste grupo ou da população do Estado.

#### 4.5 Amostragem

As amostras dos pacientes falciformes foram coletadas por conveniência após o atendimento no ambulatório e na internação conforme o comparecimento dos mesmos à instituição. Alguns foram contatados por telefone para comparecerem ao hemocentro.

As amostras dos indivíduos saudáveis foram obtidas também por conveniência no laboratório de imunohematologia de doadores de sangue.

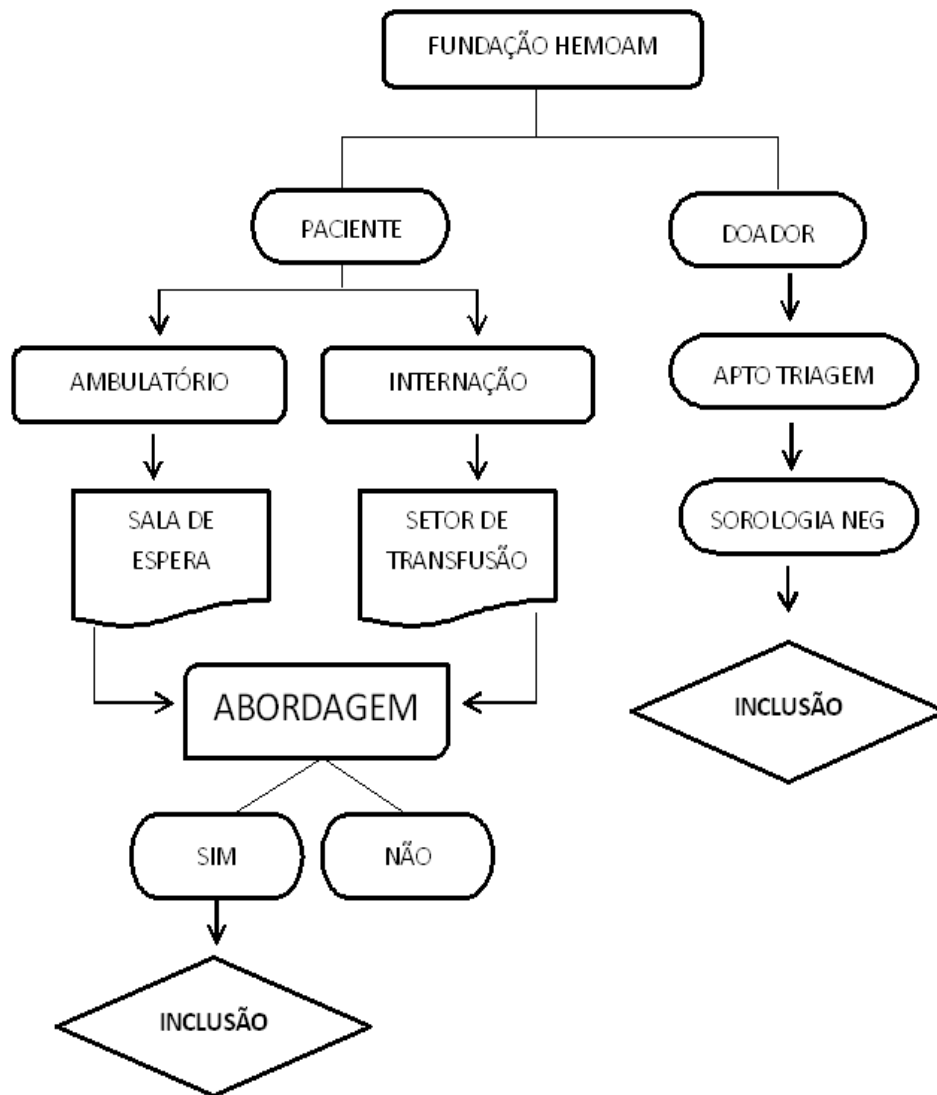
#### 4.6 Procedimento de Inclusão de Participantes no Estudo

Os pacientes ambulatoriais e internos foram convidados a participar do estudo após o atendimento médico no setor de transfusão e ambulatório de atendimento de pacientes falciformes.

O objetivo e procedimentos do estudo foram explicados verbalmente a todos os pacientes, de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com número de CAAE – 01193312.4.0000.0009, que foi assinado pelos mesmos e pelo pesquisador principal.

Os indivíduos saudáveis foram incluídos após estarem aptos nas triagens clínica, hematológica e sorológica, uma vez que no ato da doação os mesmos assinam um TCLE, autorizando a utilização de suas amostras para a realização de testes imunohematológicos, inclusive os moleculares.

Figura 2- Fluxograma da abordagem e inclusão do paciente e doador no estudo



#### 4.7 Metodologia do estudo

O estudo tratou-se de um modelo tipo observacional descritivo de corte transversal, onde foram analisados dados clínicos, laboratoriais, assim como os polimorfismos do gene *DUFFY* de pacientes falciformes.

#### 4.8 Coleta de Dados

Para a coleta dos dados foi solicitado a Diretoria Técnica da instituição autorização para manuseio dos prontuários dos pacientes que fica sobre a supervisão do SAME.

O sistema I-doctor (sistema próprio da fundação) gerencia todos os dados pessoais, datas de consultas e procedimentos solicitados como exames, necessidade de atendimento pela equipe multidisciplinar e a ainda a terapia medicamentosa aplicada de todos os pacientes. Através deste sistema foi possível identificar o registro de cada paciente e a localização dos mesmos.

Os prontuários foram analisados com foco em dados relacionados a sinais e sintomas da doença, como descrição clínica da presença de lesões, danos de órgãos, acidente vascular cerebral, quadros de infecções.

A gravidade da doença foi analisada por pontuação atribuída pela ausência ou presença dos seguintes itens:

- 1) necrose avascular da anca ou do ombro e;
- 2) anormalidades do sistema nervoso central (definido por historia de acidente vascular cerebral, convulsões ou ataque isquêmico transitório);
- 3) disfunção renal com alteração dos resultados;
- 4) Contagem de células brancas e;
- 5) úlceras de pernas.

Estes critérios foram baseados no estudo de Araba Afenyi *et al* 2008 que utilizando esses parâmetros encontrou associações da doença com o sistema Duffy. Para cada item presente foi atribuído um ponto, iniciando com uma doença branda até 5 para uma doença mais severa. Em seguida foram analisados os resultados dos polimorfismos encontrados, juntamente com a clínica e os dados laboratoriais, danos de órgãos e a severidade da doença.

#### **4.9 Dados Laboratoriais**

A coleta dos dados laboratoriais foi realizada no laboratório de análises clínicas, onde os testes são realizados por técnica de automação. No setor de hematologia foi analisado o resultado do último hemograma para o número de leucócitos e no laboratório de bioquímica foi analisado o resultado dos exames de ureia e creatinina referente ao período em que o paciente apresentou quadro de disfunção renal.

#### 4.10 Coleta das amostras

As amostras para realização da fenotipagem e genotipagem foram coletadas no laboratório de hematologia quando solicitado exames prévios para o atendimento ambulatorial ou no setor de imunohematologia quando solicitado transfusão sanguínea. A coleta é feita de sangue venoso em tubo contendo anticoagulantes com ácido etileno diamino tetra-acético EDTA, com cerca de 3 a 5 mL.

#### 4.11 Processamento das amostras

As amostras foram centrifugadas em centrifugas de mesa modelo Fanem a 3.400 r.p.m por 5 minutos. Após o processo de centrifugação foram preparadas alíquotas para os testes:

1 alíquota de 200  $\mu$ L de concentrado de hemácias contendo a camada leucoplaquetaria, utilizada para futura realização da técnica de extração de DNA, sendo armazenada em freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$  (Revco, E.U.A).

1 alíquota de 2 mL de concentrado de hemácias para a realização da fenotipagem eritrocitária do sistema Duffy e do teste TAD, sendo armazenada em temperatura de  $2^{\circ}$  a  $6^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.12 Teste de Fenotipagem

Os fenótipos do sistema Duffy foram determinados pelo método clássico de hemaglutinação em cartões de gel (Diamed AG, Morat, Switzerland), com anticorpos padronizados pela mesma empresa. Para os testes foram utilizados os seguintes reagentes: Cartão Duffy (Diamed SA) e reagentes contendo anticorpos anti-Fy<sup>a</sup> e anti-Fy<sup>b</sup> (Diamed). Técnica descrita no Protocolo n° 1 dos anexos.

Figura 3- Gel de centrifugação para fenotipagem Duffy (diamed)



Fonte: Katiane Gomes, 2014.

Os testes de hemaglutinação foram rigorosamente padronizados com a utilização de amostra controle positiva e negativa, validados no Hemocentro do Amazonas-HEMOAM, com o objetivo de garantir que a única variável nestes testes fosse à expressão antigênica dos sistemas sanguíneos, e assim obter um resultado confiável quanto à especificidade e sensibilidade.

### **4.13 Genotipagem do sistema sanguíneo Duffy**

#### 4.13.1 Extração de DNA genômico

Para extração do DNA de leucócitos de sangue venoso periférico realizamos a técnica de fenol clorofórmio utilizando kit comercial Brazol™ LAC Biotecnológica. O Brazol é a versão otimizada do método de passo único baseada na metodologia desenvolvida por Chomczynski (58). Nessa técnica o DNA pode ser obtido na interfase entre a fase orgânica e a fase aquosa, através da adição de etanol e isopropanol, seguido de lavagem com etanol.

A concentração e qualidade de todos os DNAs preparados foram analisados através da concentração de DNA, o qual foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 260 nm realizadas no Nanodrop modelo 2000 Spectrophotometer. O protocolo desse procedimento está disposto no anexo IV.

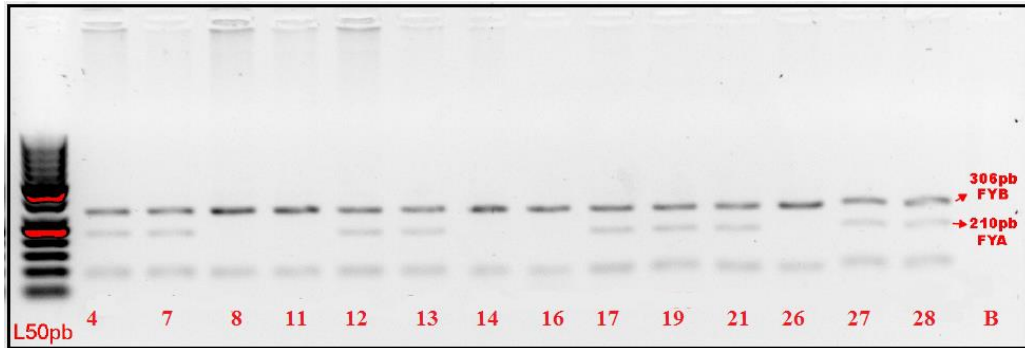
#### 4.13.2 Reação de Cadeia da Polimerase, do inglês Polimesare Chain Reaction (PCR).

No protocolo da PCR, descrito por Castilho et al, 2004, foram utilizados; 100-200 ng de DNA, 50 pmole de cada oligo nucleotídeo iniciador, 2 nmole de cada dNTP, 1.0 U *Taq* polymerase e tampão em um volume total de 60 µl como condição padrão para as análises dos genes variantes por PCR.

A genotipagem Duffy foi realizada utilizando os oligo nucleotídeo iniciador sense 5' TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC 3' e anti-sense 5' AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC 3'. Os produtos da PCR Duffy foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e visualizados com brometo de etídio, os quais apresentaram uma banda de 392 pb. Após verificação da amplificação, o produto da PCR Duffy foi tratado com a enzima de restrição *BanI* e observado, em gel de agarose 2%, visualizado com brometo de etídio. Os genótipos *FYA/FYB* apresentaram duas bandas de 210 e 306 pb, respectivamente. O gene *FYA* apresenta apenas a

banda de 210 pb e o *FYB*, a banda de 306 pb. (Protocolo n° 02 do anexo)

Figura 4: Análise RFLP de produtos de PCR amplificados com oligo nucleotídeos iniciadores *FYAB1/FYAB2* utilizando enzima de restrição *Ban I* após eletroforese em gel de agarose 2%.

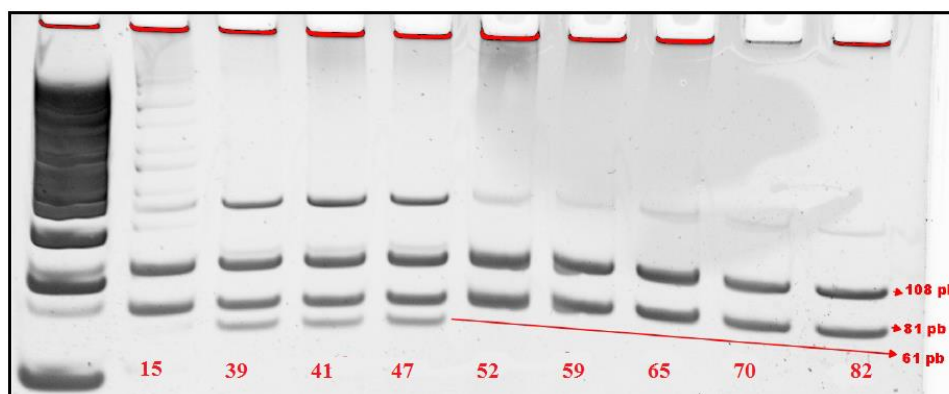


Uma alíquota do DNA, extraído de cada paciente, foi congelada para a realização de uma contraprova (quando necessário).

#### 4.13.3 Genotipagem para GATA

A técnica de PCR para verificação do polimorfismo -33 T>C no promotor GATA (Anexo n° 2) foi realizada em todos os indivíduos que tiveram resultados de fenotipagem Fy (a-b-) e genotipagem *FYB/FYB*, assim como nos fenótipos Fy(a+b-) com genótipo *FYA/FYB* e nos fenótipos Fy(a-b+) com genótipo *FYB/FYB*. Para isso foram utilizados os oligo nucleotídeos iniciadores sense 5' CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA 3' e anti-sense 5' CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG 3'. Os produtos da PCR GATA foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e visualizados com brometo de etídio, o qual apresentou uma banda de 189 pb. Após verificação da amplificação, os produtos dos PCR GATA foram tratados com enzima de restrição *StyI* e observados em gel de poliacrilamida a 12%. Os genótipos GATA MUTADO apresentam as bandas com 108 e 61 pb e os GATA NORMAL tipo selvagem, apresentam as bandas com 108 e 81 pb.(Protocolo n°2 do anexo).

Figura 5: Análise por RFLP de produtos de PCR amplificados com os oligo nucleotídeos iniciadores *FYN1/FYN2* utilizando a enzima de restrição *StyI* após eletroforese em gel de acrilamida a 12% para a detecção de mutação na posição -33 T>C do GATA box.



Os testes de Biologia Molecular foram realizados na Fundação HEMOAM com a utilização da tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), laboratório de Biologia Molecular, do setor de Pesquisa do Hemocentro da UNICAMP, sob responsabilidade da Dra. Lilian Castilho.

#### 4.14 Considerações Éticas

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM para análise e obteve aprovação em 08 de fevereiro de 2013, pelo parecer de nº 213.167, CAAE: 011933124.000.

#### 4.15 Métodos Estatísticos

A análise foi realizada através do pacote R Core Team (2012), R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. Foram aplicados testes Chi quadrado e exato de Fisher para análise das variáveis categóricas ou qualitativas.



O valor crítico do nível de significância por nós pré-estabelecido foi de 0,05.

## 5 RESULTADOS

O número de pacientes falciformes cadastrados na fundação Hemoam é de 202 pacientes, porém durante o período do estudo só foi possível coletarmos um número de 120 amostras, sendo que não foi possível a coleta de todos os pacientes em virtude da dificuldade geográfica para localização dos pacientes residentes no interior do Estado, pacientes que não compareceram as consultas agendadas, evasão do tratamento e ainda pacientes que estão residindo em outros Estados. Para o grupo de indivíduos saudáveis foram inseridos no estudo um número de 247 doadores de sangue que serviu para comparação da frequência dos genótipos Duffy com o grupo dos pacientes falciformes.

Foram realizados os testes de fenotipagem e genotipagem para os dois grupos e os resultados foram comparados quanto à frequência do sistema Duffy, a fim de identificarmos se os resultados obtidos do grupo de pacientes falciformes são característicos da doença ou da população do Estado.

Tabela 2: Comparação da frequência da genotipagem Duffy entre pacientes falciformes e indivíduos saudáveis

Genotipagem	Participantes do Estudo				P Fisher
	Paciente		Doador		
	n°	%	n°	%	
<i>FYA/FYB</i>	48	40,00	77	31,17	0.11(ns)
<i>FYA/FYA</i>	12	10,00	53	21,45	0.010(ns)
<i>FYA/FYB<sup>WEAK</sup></i>	-	-	2	0,80	0.81(ns)
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	13	10,83	30	12,14	0.84(ns)
<i>FYB/FYB</i>	32	26,66	49	19,83	0.17(ns)
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	12	10,00	24	9,71	1(ns)
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	3	2,5	10	4,04	0.65(ns)
<i>FYB/FYB<sup>WEAK</sup></i>	-	-	2	0,80	0.81(ns)
Total	120	100	247	100,00	

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Pode se observar na tabela 2 uma diferença na frequência dos genótipos *FYA/FYA*, e *FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup>* entre pacientes falciformes e os indivíduos saudáveis.

Os dados relacionados às manifestações da doença falciforme, coletados dos prontuários dos pacientes, serviram de critérios para caracterização de um estágio brando até uma forma mais severa da doença. Estas foram pontuadas de acordo com a quantidade apresentada por cada paciente, sendo elas: AVC, Disfunção renal, osteonecrose, úlceras de perna e alteração no número de leucócitos. A tabela 2 descreve a distribuição dos pacientes de acordo com o grau encontrado.

Tabela 3: Manifestações da doença falciforme

Grau das manifestações da Doença Falciforme			
Gravidade	n°	%	P
0	9	7,5	0,279(ns)
1	50	41,67	
2	44	36,67	
3	15	12,5	
4	2	1,66	
5	0	0	
Total	120	100	

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Pode se observar que 41,67% dos pacientes apresentavam pontuação 01 o que refere à apresentação de um único sintoma e que 36,67% apresentaram grau 2 e que nenhum paciente apresentou-se com o grau 5.

Foram realizados os testes de fenotipagem e genotipagem de acordo as técnicas descritas na metodologia para a identificação dos fenótipos e genótipos dos pacientes falciformes, nos quais foram encontrados 28 (23,33%) pacientes com o polimorfismo na região -33 T/C do gene promotor GATA caracterizado pela não expressão do antígeno Fy<sup>b</sup> na membrana das hemácias.

Na tabela 4, os fenótipos e genótipos Duffy, foram relacionados com o grau de manifestação da doença falciforme.

Tabela 4: Associação da gravidade da doença falciforme com o Sistema Duffy

Feno Duffy	Geno Duffy	0		1		2		3		4		T	
		n	% Linha % Coluna	n	% L % C	n	% L % C	n	% L % C	n	% L % C	N	%
Fy(a+b+)	<i>FYA/FYB</i>	05	10,41 55,5	21	43,75 42,00	16	33,33 36,36	06	12,5 40,00	-	-	48	100
Fy(a+b-)	<i>FYA/FYA</i>	01	8,33 11,11	07	58,33 14,00	04	33,33 09,09	-	-	-	-	12	100
	<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	03	23,07 6,00	09	69,23 20,45	-	-	01	7,69 50,00	13	100
	<i>FYB/FYB</i>	03	9,37 33,33	11	34,37 22,22	11	34,37 25,00	06	18,75 40,00	01	3,12 50,00	32	100
Fy(a-b+)	<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	6	50,0 12,00	4	33,33 9,09	02	16,66 13,33	-	-	12	100
Fy(a-b-)	<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	2	66,66 4,00	-	-	01	33,33 6,66	-	-	03	100
Total		09	7,5 100	50	41,66 100	44	36,66 100	15	12,5 100	02	1,66 100	120	100

Teste de Fisher: valor (p=0,2354)

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Pode-se observar na tabela 4 uma associação estatisticamente significativa entre o genótipo *FYA/FYA* e *FYB/FYB<sup>ES</sup>* com o grau 1 e a relação do genótipo *FYA/FYB<sup>ES</sup>* com o grau 2.

Observou-se que dos 120 pacientes 55 apresentaram crises de vaso oclusão como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5: A vaso oclusão em pacientes falciformes

Genotipagem <i>Duffy</i>	Vaso oclusão				Total	
	SIM		NÃO		n°	%
	n°	% L %C	n°	% L %C		
<i>FYA/FYB</i>	26	54,16 47,27	22	45,83 33,84	48	100
<i>FYA/FYA</i>	5	41,66 9,09	7	58,33 10,76	12	100
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	5	38,46 9,09	8	61,53 12,30	13	100
<i>FYB/FYB</i>	13	40,62 23,63	19	59,37 29,23	32	100
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	3	25,00 5,45	09	75,00 13,84	12	100
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	3	100 5,45	-	-	03	100
Total	55	45,83 100	65	54,16 100	120	100

Teste de Fisher  $p=0,1913$  (ns)

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Encontramos que os pacientes com vaso oclusão a maior frequência estava relacionada com o genótipo *FYA/FYA*.

Dos 120 pacientes apenas 9 apresentaram AVC.

Tabela 6: A manifestação de AVC nos pacientes falciformes

Genotipagem <i>Duffy</i>	AVC				Total	
	SIM		NÃO		n°	%
	n°	% L %C	n°	% L %C		
<i>FYA/FYB</i>	6	12,5 66,66	42	87,5 37,83	48	100
<i>FYA/FYA</i>	-	-	12	100 10,81	12	100
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	13	100 11,71	13	100
<i>FYB/FYB</i>	2	6,25 22,22	30	93,75 27,02	32	100
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	1	8,33 11,11	11	91,66 9,09	12	100
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	3	100 2,70	3	100
Total	9	7,5 100	111	92,5 100	120	100

Teste de Fisher  $p=0,6712$

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Observou-se que não houve relação do AVC com os resultados encontrados da

genotipagem *Duffy* e que a frequência desta manifestação em pacientes falciformes é de aproximadamente 7,5%.

Para a manifestação osteonecrose encontramos apenas 13 pacientes.

Tabela 7: A manifestação osteonecrose em pacientes falciformes

Genotipagem <i>Duffy</i>	Osteonecrose				Total	
	SIM		NÃO		n°	%
	n°	% L %C	n°	% L %C		
<i>FYA/FYB</i>	3	6,25 23,07	45	93,75 42,05	48	100
<i>FYA/FYA</i>	--	-	12	100 11,21	12	100
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	3	23,07 23,07	10	76,92 9,34	13	100
<i>FYB/FYB</i>	5	15,62 38,46	27	84,37 25,23	32	100
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	1	8,33 7,69	11	91,67 0,10	12	100
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	1	33,33 7,69	2	66,67 1,86	3	100
Total	13	10,83 100	107	100	120	100

Teste de Fisher  $p=0,1534$

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

A osteonecrose apresentou um percentual de 10,83% nos pacientes falciformes e não apresentou nenhuma relação com o sistema Duffy.

Pode se observar que apenas 30 pacientes apresentaram quadro de disfunção renal.

Tabela 8: Pacientes com disfunção renal

Genotipagem <i>Duffy</i>	Disfunção Renal				Total	
	SIM		NÃO		n°	%
	n°	% L %C	n°	% L %C		
<i>FYA/FYB</i>	16	47,05 53,33	32	66,66 35,55	48	100
<i>FYA/FYA</i>	2	16,66 6,66	10	83,33 11,11	12	100
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	2	15,38 6,66	11	84,61 12,22	13	100
<i>FYB/FYB</i>	7	21,87 23,33	25	78,12 27,77	32	100
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	2	16,66 6,66	10	83,33 2,22	12	100
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	1	33,33 3,33	2	66,67 2,22	3	100
Total	30	25,00 100	90	75,00 100	120	100

Teste de Fisher  $p=0,6478$

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

No quadro de disfunção renal encontramos um percentual de 25% e uma associação relacionada com o gene *FYA/FYB* com 16% e para *FYB/FYB* 7%.

Quanto a úlcera de perna pode-se observar que apenas 7 pacientes apresentaram úlcera de perna localizado principalmente na área do tornozelo.

Tabela 9: Pacientes que apresentaram úlcera de perna

Genotipagem <i>Duffy</i>	Úlcera de perna				Total	
	SIM		NÃO		n°	%
	n°	% L %C	n°	% L %C		
<i>FYA/FYB</i>	2	4,16 28,57	46	95,84 40,70	48	100
<i>FYA/FYA</i>	-	-	12	100 10,61	12	100
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	2	15,38 28,57	11	84,61 9,73	13	100
<i>FYB/FYB</i>	1	3,12 14,28	31	96,87 27,43	32	100
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	2	16,66 28,57	10	83,33 8,84	12	100
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	3	100 2,65	3	100
Total	7	5,83 100	113	94,16 100	120	100

Teste de Fisher p=0.2435

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Na manifestação de úlcera de perna foi encontrado um percentual de 5,83% nos pacientes falciformes, contudo este número não é suficiente para relacionar com o gene *Duffy*.

Para análise de pacientes que apresentaram alteração no número de células observou se a contagem de leucócitos, os resultados foram analisados em parâmetros abaixo de 11.000, de 11.001 a 19.500 e de 19.501 até 28.050.

Tabela 10- Contagem de Células (Leucócitos)

Genotipagem <i>Duffy</i>	Leucócitos						Total	
	< 11.000		11.001 – 19.500		>19.501		n°	%
	n°	% L %C	n°	% L %C	n°	% L %C		
<i>FYA/FYB</i>	10	20,83 45,45	34	70,33 37,77	4	8,33 50,00	48	100
<i>FYA/FYA</i>	3	25,00 13,63	9	75,00 100,00	-	-	12	100
<i>FYA/FYB<sup>ES</sup></i>	-	-	13	100,00 14,44	-	-	13	100
<i>FYB/FYB</i>	4	12,5 18,18	25	78,12 27,77	3	9,37 37,50	32	100
<i>FYB/FYB<sup>ES</sup></i>	4	33,33 18,18	7	58,33 7,77	1	8,33 12,5	12	100
<i>FYB<sup>ES</sup>/FYB<sup>ES</sup></i>	1	33,33 4,54	2	66,66 2,22	-	-	3	100
Total	22	18,33 100	90	75,00 100	8	6,66 100	120	100

**Teste de Fisher p=0,492(ns)**

(ns): p-valor maior que 0,05, portanto, não há diferença estatística significativa.

Mediante a divisão dentro dos parâmetros estabelecidos obteve-se um percentual de 75% dos pacientes que apresentaram resultados entre o parâmetro de 11.001 – 19,500.



## 6 DISCUSSÃO

### 1) Frequência de genótipos Duffy em pacientes falciformes.

Quando comparados com os indivíduos saudáveis (doadores de sangue) encontramos uma diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,01$ ) quanto ao genótipo *FYA/FYA*, que apresentou-se menos frequente em pacientes falciformes.

Do ponto de vista da recepção de citocinas, pela glicoproteína Duffy, alguns trabalhos como o de Araba Afenyi e o de Grazielle Mecabo compararam apenas os genótipos *FYBES/FYBES*, que não apresentam expressão da glicoproteína Duffy com os genótipos Duffy positivos, porém em nosso trabalho, por termos uma frequência baixa deste genótipo Duffy negativo, apenas 3 pacientes, comparamos os graus de gravidade da doença falciforme entre os diferentes genótipos Duffy pelo fato de que, dependendo do polimorfismo encontrado acontece também uma graduação na expressão da glicoproteína Duffy (Zimmerman, 2013).

Os alelos *FYB<sup>ES</sup>* não são expressos na membrana da hemácia pelo fato de apresentarem um polimorfismo na região promotora GATA -33T/C, o que significa que a glicoproteína Duffy estaria apenas parcialmente expressa e com isto com sua função de escoadouro reduzida o que teoricamente poderia impactar em manifestações clínicas na doença falciforme. Contudo o estudo atual apresentou para este fenótipo um achado de 10% em relação ao polimorfismo na região -33 T/C do gene promotor GATA em heterozigose e ainda 3 (2,5) em homozigose, porém não foi encontrado o polimorfismo *FYA/FYB<sup>WEAK</sup>* e *FYB/FYB<sup>WEAK</sup>* no grupo de pacientes falciformes do estudo.

Um ponto que deve ser abordado neste sentido é a diferença estatisticamente significativa entre nossos pacientes falciforme e indivíduos saudáveis do Estado do Amazonas, que apesar de serem da mesma região geográfica apresentaram uma diferença em relação ao genótipo *FYA/FYA* o que é no mínimo intrigante. O sistema Duffy funciona como um

escoadouro de aproximadamente 16 quimiocinas que podem estar envolvidas em diversos aspectos da resposta imune, por este motivo não elegemos uma quimiocina para realizar suas dosagens através de uma citometria de fluxo, o que poderia representar um viés em nossas análises. Em nossos resultados este genótipo Duffy apresentou-se com 07 pacientes (58,33%) *FYA/FYA*, relacionados ao grau 1 de gravidade sendo este considerado em nossa graduação, como um sinal brando da gravidade desta doença.

## 2. Graus de severidade da doença falciforme

Quanto aos graus de gravidade observamos que 50 (41,67%) dos pacientes deste estudo apresentaram-se relacionados ao grau 1, que trata-se de uma gravidade considerada branda, pois estes apresentaram apenas uma manifestação clínica da doença. Por outro lado, o grau 4 trata-se de um grau de manifestação considerado severo onde apenas 2 (1,66) pacientes foram incluídos.

Das manifestações da doença falciforme, observamos que a vaso oclusão é uma das principais ocorrências desta doença que se apresenta em diferentes estágios e gravidade o que pode desencadear inúmeras outras manifestações clínicas (Pathare, kindi et al 2003), neste estudo esta manifestação não foi definida como critério de gravidade em razão de ser uma característica inicial da doença, que pode estar relacionada a inúmeros fatores. Neste estudo, 55 (45,83%) pacientes apresentam ou apresentaram quadros de vaso oclusão em diferentes idades, estando neste estudo, mais associada, aos pacientes nas 3 primeiras décadas de vida, quando se dá o período da descoberta da doença e a utilização de terapia medicamentosa como o Hidroxiuréia como forma de diminuir os casos de vaso oclusão, cerca de 72,00% desses pacientes fazem uso deste medicamento constantemente e 60% está relacionado com os genótipos positivos do sistema Duffy. Todos os pacientes que apresentam quadro de vaso

oclusão fazem uso de opióides que varia de dose e do tempo de tratamento, sendo os mais comuns à morfina, o tramadol, o paracetamol+codeína e ainda como nova opção de tratamento a oxicodona.

Para tanto, tratamos esta manifestação separadamente das demais distribuindo os pacientes acometidos de acordo com o seu genótipo Duffy e observamos que entre os pacientes com vaso oclusão, 26 (47,27%) apresentavam o genótipo *FYA/FYB*, seguido por 13 (23,63%) com o genótipo *FYB/FYB*. Curiosamente uma baixa porcentagem de pacientes com os genótipos *FYA/FYA*, *FYA/FYBES*, *FYB/FYBES* e *FYBES/FYBES* apresentaram esta manifestações. Neste caso esperávamos um resultado completamente contrário ao encontrado, uma vez que a quimiocina CXCL8, intimamente associada a esta manifestação, segundo Akalin e Neylan, seria menos escoada dos locais de vaso oclusão em pacientes com menores expressões de glicoproteína Duffy como no caso dos genótipos (*FYA/FYBES*, *FYB/FYBES* e *FYBES/FYBES*). Analisando a frequência alélica Duffy entre os pacientes que apresentaram vaso oclusão, observamos que 55(50%) apresentavam o alelo *FYB*, 41(37,27%), o alelo *FYA* e que apenas 14 (12,7%) o alelo *FYBES*, demonstrando que esta manifestação pode estar associada a outras quimiocinas além da CXCL8.

### 3. Associação do grau de severidade da doença com os genótipos Duffy

Quando realizado a associação dos genótipos Duffy com os graus de severidade da doença falciforme, observa-se que os pacientes que apresentaram genótipagem *FYA/FYB* o que equivalia a 43,75% destes pacientes estavam mais relacionados com o grau 1 o que demonstrava a ocorrência de apenas uma das manifestações, contudo encontramos 32 pacientes com o genótipo *FYB/FYB*, sendo que este genótipo foi o que se apresentou melhor distribuído entre os graus de manifestações e ainda apresentou pacientes entre todos os graus, sendo mais prevalente no grau 1 e 2 com 11(34,37) e no grau 4 com 1 pacientes.

Nosso estudo apresentou algumas limitações, dentre elas o número de amostra foi considerado pequeno para algumas complicações e o período de estudo para admissão foi limitado há dois anos o que impossibilitou de coletarmos um número maior de amostra.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e das associações realizadas podemos concluir que:

- 1- Entre os resultados fenotípicos e genotípicos encontrados, 76,67% dos testes se mostraram concordantes.
- 2- Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos genótipos *DUFFY* quando comparados com os graus de manifestações da doença falciforme.
- 3- Quando comparadas às frequências entre os pacientes falciformes e o grupo de indivíduos saudáveis, encontramos uma frequência menor para o genótipo *FYA/FYA* nos pacientes falciformes.
- 4- Os pacientes falciformes que apresentaram quadros de vaso-oclusão estavam mais relacionados com genótipos *FYA/FYB*, bem como a utilização do medicamento hidroxiuréia e medicamentos opióides.
- 5- Dentre os pacientes falciformes encontramos 50 (41,67%) apresentaram pelo menos uma das manifestações elencadas e que apenas 2 (1,66%) apresentaram-se com quatro das manifestações.
- 6- O polimorfismo na região promotora *GATA -33 T/C* se apresentou em 28 (23,33%) dos pacientes falciformes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFENYI-ANNAN, A. et al. Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. **Transfusion**, v. 48, n. 5, p. 917–924, maio 2008.

AKALIN, E.; NEYLAN, J. F. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. **Transplantation**, v. 75, n. 9, p. 1496–1500, 15 maio 2003.

ANGULO, I. L. Acidente vascular cerebral e outras complicações do Sistema Nervoso Central nas doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 262–267, 2007.

ARAÚJO, N.; BEZERRA, M. Fenótipo DUFFY não tem associação com a expressão das manifestações clínicas na anemia falciforme. 2011.

BRAGA, J. A. P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 233–238, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: saiba o que é e onde encontrar tratamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: úlcera: prevenção e tratamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças falciformes. Brasília: ANVISA; 2001. 142p

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects**. 1 ed: W.B. Saunders Company, 1986, 690p.

CANÇADO, R.; LOBO, C.; ANGULO, I. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 361–366, 2009.

CASTILHO, L. et al. A novel FY allele in Brazilians. **Vox sanguinis**, v. 87, n. 3, p. 190–195, out. 2004.

CHAUDHURI, A et al. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 22, p. 10793–10797, 15 nov. 1993.

CHAUDHURI, A et al. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. **Blood**, v. 85, n. 3, p. 615–621, 1 fev. 1995.

CHAUDHURIF, A. et al. Expression of the Dum Antigen in K562 Cells EVIDENCE THAT IT IS THE HUMAN ERYTHROCYTE CHEMOKINE RECEPTOR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 7835–7838, 1994.

CHOWN, B.; LEWIS, M.; KAITA, H. The Duffy Blood Group System in Caucasians: Evidence for a New Allele. **American journal of human genetics**, v. 17, n. 5, p. 384–389, set. 1965.

COSTA, F. F. **Anemia Falciforme. Hematologia – Fundamentos e Prática**. Atheneu: São Paulo, 2004.

COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L, KUMAR. Red cells and bleeding disorders **.Robbins pathologic basis of disease**, 6<sup>o</sup>ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994.

DI NUZZO, D.V.P.; FONSECA, S.F. Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria*, v. 80, n.5, p. 347-354, 2004.

DONAHUE, R. P. et al. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 61, n. 3, p. 949–955, nov. 1968.

EBONG, W. W. The treatment of severely ill patients with sickle cell anemia and associated septic arthritis. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 149, p. 145–159, jun. 1980.

EMBURY, S. H. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. **Cecil tratado de medicina interna**. 20<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

FIGUEIREDO, M. S. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 313–315, 2007.

GAY, J. C.; PHILLIPS, J. A III.; KAZAZIAN, H. H. Jr. Hemoglobinopathies and thalassemias. **Principles and practice of medical genetics**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Churchill

Livingstone, 1997.

GÓMEZ-CHIARI, M.; PUIGBERT, J. T.; ARAMBURU, J. O. Drepanocitosis: experiencia de un centro. **Anales de Pediatría**, v. 58, n. 2, p. 95–99, fev. 2003. HADLEY, T. J. et al. Postcapillary Venule Endothelial Cells in Kidney Express a Multispecific Chemokine Receptor That Is Structurally and Functionally Identical to the Erythroid Isoform, Which Is the Duffy Group Antigen. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, p. 985–991, 1994.

HADLEY, T. J.; PEIPER, S. C. From Malaria to Chemokine Receptor: The Emerging Physiologic Role of the Duffy Blood Group Antigen. **The Journal of The American Society of Hematology**, v. 89, n. 9, p. 3077–3091, 1997.

HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **Journal of neurovirology**, v. 5, n. 1, p. 13–26, fev. 1999.

HORUK, R. et al. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. **Biochemistry**, v. 32, n. 22, p. 5733–5738, jun. 1993.

IWAMOTO, S. et al. Characterization of the Duffy gene promoter: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 222, n. 3, p. 852–859, 24 maio 1996.

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

KEOGHANE, S. R.; SULLIVAN, M. E.; MILLER, M. A. W. The aetiology, pathogenesis and management of priapism. **BJU international**, v. 90, n. 2, p. 149–154, jul. 2002.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of leukocyte biology**, v. 85, n. 2, p. 235–242, fev. 2009.

MAGALHÃES, I.Q; Alterações renais nas doenças falciformes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 279-284, 2007.

MALLINSON, G. et al. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. **British journal of haematology**, v. 90, n. 4, p. 823–829, ago. 1995.



MATHEW, S. et al. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (FY) at 1q22-->q23 by fluorescence in situ hybridization. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 67, n. 1, p. 68, jan. 1994.

MECABO, G. et al. Duffy-negative is associated with hemolytic phenotype of sickle cell anemia. **Clinical immunology**, v. 136, n. 3, p. 458–459, set. 2010.

MINNITI, C. P. et al. Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 10, p. 831–833, 2010.

MURPHY, P. M. The Molecular Biology of Leukocyte Chemoattractant Receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 593–633, 1994.

NEBOR, D. et al. Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. **Clinical immunology**, v. 136, n. 1, p. 985–990, jul. 2010.

NEOTE, K. et al. Identification of a Promiscuous Inflammatory Peptide Receptor on the Surface of Red Blood Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12247–12249, 1993.

NEOTE, K. et al. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. **Blood**, v. 84, n. 1, p. 44–52, 1 jul. 1994.

NETO, G.C.G.; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

NICHOLS, M. E. et al. A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to *Plasmodium vivax*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. September, p. 776–785, 1987.

NOVARETTI, M. C. Z. et al. Rapid Duffy Genotyping in Sickle Cell Disease Patients Using PCR-SSP Is a Valuable Tool for Blood Component Selection. **ASH Annual Meeting Abstracts**, v. 110, n. 11, p. 2901, 16 nov. 2007.

OKPALA, I. E. New therapies for sickle cell disease. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 975–987, out. 2005.

OLSSON, M. L. et al. The Fy x phenotype is associated with a missense mutation in the Fy b allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. **British journal of haematology**, v. 103, n. 4, p. 1184–1191, dez. 1998.

PARASOL, N. et al. A novel mutation in the coding sequence of the FY\*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2237–2243, 1 out. 1998.

PATHARE, A. et al. Cytokines in sickle cell disease. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 8, n. 5, p. 329–337, out. 2003.

PEIPER, B. S. C. et al. The Duffy Antigen/Receptor for Chemokines (DARC) Is Expressed in Endothelial Cells of Duffy Negative Individuals Who Lack the Erythrocyte Receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1311–1317, 1995.

POGO, A. O.; CHAUDHURI, A. The duffy protein: A malarial and chemokine receptor. **Seminars in Hematology**, v. 37, n. 2, p. 122–129, abr. 2000.

PRYOR, J. et al. Priapism. **The journal of sexual medicine**, v. 1, n. 1, p. 116–20, jul. 2004.

QUIROLO, K. How do I transfuse patients with sickle cell disease? **Transfusion**, v. 50, n. 9, p. 1881–1886, set. 2010.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 11 dez. 2010.

ROGERS, Z. R. Priapism in sickle cell disease. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 917–928, out. 2005.

SILLA, L.M.R. Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil. **Jornal de Pediatria** - vol. 75, nº3, 1999;

SOLANKI, D. L.; KLETTER, G. G.; CASTRO, O. Acute splenic sequestration crises in adults with sickle cell disease. **The American journal of medicine**, v. 80, n. 5, p. 985–990, maio 1986.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343–1360, 2004.

TOURNAMILLE, C. et al. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. **Human genetics**, v. 95, n. 4, p. 407–410, abr. 1995a.

TOURNAMILLE, C. et al. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nature genetics**, v. 10, n. 2, p. 224–228, jun. 1995b.

TOURNAMILLE, C. et al. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. **Blood**, v. 92, n. 6, p. 2147–2156, 15 set. 1998.

VAN-DÚNEM J.C.V.D. **Fatores prognósticos associados ao óbito por anemia falciforme em crianças internadas no hospital pediátrico de Luanda – Angola 75 (1997-2002): Um estudo de coorte.** Pernambuco, 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde Materno Infantil). Instituto Materno Infantil de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Saúde Materno Infantil.

VICARI, P. Contribuição dos polimorfismos das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 na hipertensão pulmonar da anemia falciforme. **Disciplina de hematologia e hemoterapia.** São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2007.

WHO. A divisory Group on Herediatry Disease, Geneve: **WHO**, 1985

YAZDANBAKHS, K. et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. **Transfusion**, v. 40, n. 3, p. 310–320, mar. 2000.

YOONG, W. C.; TUCK, S. M. Menstrual pattern in women with sickle cell anaemia and its association with sickling crises. **Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology**, v. 22, n. 4, p. 399–401, jul. 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.

ZIMMERMAN, P. A et al. Emergence of FY\*A(null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 24, p. 13973–13977, 23 nov. 1999.

### APÊNDICE A - Equipe Científica

NOME	FORMAÇÃO	TITULO	ORGÃO	ATIVIDADE
Sérgio Albuquerque	Farmacêutico	Doutor	Hemoam	Imunohematologista
Rechfy Kasem	Biomédica	Graduada	HEMOAM	Biologia Molecular
Janaina Santana	Enfermeira	Graduada	UEA	Biologia Molecular
Lucianna Tezza	Farmacêutica	Graduada	UFAM	Biologia Molecular
Alexandre Terço	Acad. Farmácia	Graduando	UNINORTE	Bolsista PAIC
Agnes Lima	Acad. Biomedicina	Graduanda	UNICEL	Bolsista PAIC
Diana Silva	Acad. Biomedicina	Graduanda	UNICEL	Bolsista PAIC
Lya de Assis	Biomédica	Graduada	FAPEAM	Bolsista DCTA
Nayane de Paula	Biomédica	Graduada	FAPEAM	Bolsista DCTA
Edalton Sanguino	Biólogo	Especialista	UFAM	Biotecnologia
Edson Lira	Estatístico	Especialista	HEMOAM	Análise estatística





### APÊNDICE D - Cronograma de execução 2014

DESCRIÇÃO	MESES												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Bibliografia	*	*											
Coleta das Amostras	*												
Realização dos testes sorológicos													
Realização dos testes Moleculares	*	*	*										
Análise dos Resultados Laboratoriais		*	*	*									
Análise Estatística				*	*	*							
Elaboração Final da Dissertação		*	*	*	*	*	*	*	*				
Apresentação da Dissertação									*				

## APÊNDICE E

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Estudo da associação dos polimorfismos DUFFY com a severidade da doença falciforme

#### INFORMAÇÕES PARA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NESSE ESTUDO.

Este estudo tem como objetivo tipar grupos sanguíneos importantes para transfusão sanguínea em doadores de sangue e pacientes hematológicos do HEMOAM. Caso você aceite participar como voluntário, necessitaremos de suas informações pessoais (nome, idade, data, local de nascimento, etc), assim como sua autorização para realizarmos tipagem sanguínea a partir do sangue que será colhido através da veia do braço que é a mesma usada para a doação de sangue. Os exames serão realizados no laboratório de tipagem sanguínea do HEMOAM. Sua participação neste estudo é voluntária, sendo estes participantes doadores aptos nas triagens clínica, hematológica e sorológica, pacientes hematológicos do HEMOAM. O procedimento da coleta do sangue será realizado por um profissional treinado, utilizando agulhas, bolsa de sangue e tubos descartáveis o que reduzirá o risco de alguma contaminação durante o processo de coleta, sendo o único desconforto a penetração da agulha na veia do braço durante o procedimento da coleta de sangue. O voluntário tem o direito de conversar com o pesquisador, Doutor Sérgio Roberto Lopes Albuquerque, diariamente nos períodos da manhã e da tarde no HEMOAM situado à Avenida Constantino Nery, nº 4.397, Chapada, esquina com a Avenida Pedro Teixeira ou pelo telefone 3655-0129, em qualquer fase do estudo, para pedir qualquer tipo de esclarecimento, ou se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética deste estudo. É garantida ao voluntário a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento, deixando assim de participar do estudo sem qualquer prejuízo ao mesmo. Neste estudo, o esperado é que não haja perdas ou danos físico ou moral por parte dos participantes, porém havendo tais ocorrências, estas devem ser comunicadas imediatamente ao pesquisador principal que deverá avaliar e tomar as devidas providências se for assim necessário. Os participantes não terão suas identidades divulgadas durante o período de execução do estudo, assim como em publicações posteriores. Os participantes deste estudo não terão nenhuma despesa ou compensação financeira, ou algum benefício adicional, por participar deste trabalho, mas estará contribuindo para o conhecimento científico. Ainda assim, se houver algum prejuízo financeiro, o pesquisador responsável poderá ressarcir-lo.

A PARTICIPAÇÃO É VOLUNTÁRIA. ISTO QUER DIZER QUE O PACIENTE TEM TODO O DIREITO DE NÃO PARTICIPAR OU SE RETIRAR DO ESTUDO, EM QUALQUER FASE DA PESQUISA, e isto não trará nenhum prejuízo, e que terá garantido o seu tratamento, conforme a rotina do serviço local se necessário. A pessoa que aceitar participar da pesquisa guarda uma cópia deste documento que será assinado duas vezes, das quais uma cópia ficará com o pesquisador e a outra com o paciente.

Eu,..... recebi a explicação de que serei um(a) dos (as) participantes dessa pesquisa. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta



página o meu nome. E por estar devidamente informado (a) e esclarecido (a) sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresse meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

Manaus, ..... / ..... / .....

.....  
Assinatura do paciente ou representante legal ou  
Impressão do polegar direito do paciente,  
caso este não saiba escrever seu nome.

PESQUISADOR: .....

TESTEMUNHA:.....

## APÊNDICE F

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo do impacto nas rejeições imunes em terapia celular dos sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich no Hemocentro do Amazonas.

**Pesquisador:** Sérgio Roberto Lopes Albuquerque

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.  
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 3

**CAAE:** 01193312.4.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 213.167

**Data da Relatoria:** 08/02/2013

**Apresentação do Projeto:**

Introdução: Estratégias para aumentar a segurança transfusional tem sido cada vez mais necessárias nos serviços de hemoterapia. A genotipagem de grupos sanguíneos pode reduzir as reações transfusionais hemolíticas com a transfusão de bolsas compatíveis em pacientes com alo anticorpos dirigidos contra antígenos de alta frequência, assim como em indivíduos com auto anticorpos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo: Determinar a frequência dos sistemas Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton e Gerbich em pacientes, gestantes e doadores de sangue atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O procedimento da coleta do sangue será realizado por um profissional treinado, utilizando agulhas, bolsa de sangue e tubos descartáveis o que reduzirá o risco de alguma contaminação durante o processo de coleta, sendo o único desconforto a penetração da agulha na veia do braço durante o procedimento da coleta de sangue.

**Endereço:** Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq

**Bairro:** Chapada **CEP:** 69.050-002

**UF:** AM **Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3655-0113 **Fax:** (92)3655-0112

**E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

## ANEXO A – PROTOCOLO 01

### PROTOCOLOS LABORATORIAIS

#### 1. Coleta da Amostra:

Não há necessidade de qualquer preparação do paciente para a coleta do material. O sangue deve ser coletado através de técnica asséptica, com anticoagulante EDTA, heparina ou citrato.

### PROTOCOLO 01

#### Técnica de fenotipagem Duffy.

Material utilizado:

Hemácias anticoaguladas (EDTA)

Anticorpos Anti-Fya de origem humana (Diamed)

Anticorpos Anti-Fyb de origem humana(Diamed)

Cartões de gel centrifugação com gel de sephadex, contendo soro poliespecífico antiglobulina humana (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal, linhagem celular C 139-9), suspensos em gel.

O procedimento Técnico de fenotipagem pela técnica de gel centrifugação, consiste em inicialmente lavar as hemácias a serem fenotipadas, três vezes com solução salina 0,9%, centrifugando por 1 minuto a 3.500 rpm cada lavagem, para então preparar uma suspensão das hemácias a serem fenotipadas a 1% em solução de baixa força iônica(LISS).Em seguida identificamos o cartão de gel centrifugação e pipetamos 50 uL dos reagentes anti-Fya e anti-Fyb nos respectivos canalículos no cartão de gel. Em seguida dispensamos 25 uL da suspensão de hemácias a ser testada em cada 1 dos dois tubos. O cartão foi incubado por 10 minutos a 37°C em banho seco e centrifugado em seguida por 10 minutos. A leitura foi realizada de acordo com os padrões do fabricante, descritos abaixo.

Interpretação dos resultados

Reação Positiva ++++ Hemácias totalmente concentradas na parte superior do gel após a centrifugação.

Reação Positiva +++: Hemácias concentradas na parte superior, porém se estendendo ao 1º terço superior do gel.

Reação Positiva ++: Hemácias se estendendo da parte superior do gel até a parte central do canalículo.

Reação Positiva +: Hemácias se estendendo da parte central do gel até a parte inferior do canalículo.

Reação negativa: Hemácias totalmente concentradas na parte inferior do gel após a centrifugação.

Controles: amostras positivas e negativas conhecidas devem ser incluídas em conformidade com as diretrizes relevantes para o controle de qualidade.

## ANEXO B - PROTOCOLO 02

### Extração de DNA (Brazol TM LAC Biotecnologia)

1. Fase de Pré Extração:
  - a) Certificar se o banho-maria está na temperatura ideal de 56°C;
  - b) Verificar a disponibilidade de microtubos de 2.0mL;
  - c) Verificar se existe quantidade suficiente das soluções de etanol 100% e clorofórmio.
  
2. Fase de Extração de DNA:
  - a) Pipetar 200µL da amostra de sangue em um tubo de 2.0mL, devidamente identificado. A amostra de sangue deve ser homogeneizada antes de pipetar. Em algumas situações é possível pipetar o creme leucocitário;
  - b) Adicionar 400µL de Brazol gelado a 4°C e misturar no vortex até que a amostra adquira aspecto homogêneo;
  - c) Adicionar 100µL de clorofórmio gelado a 4°C e misturar no vortex até que a amostra adquira uma coloração “cor de chocolate”;
  - d) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura Ambiente (T.A);
  - e) Após a centrifugação, retirar o microtubo cuidadosamente da centrífuga e verificar se a solução está dividida em 2 partes;
  - f) Pipetar cuidadosamente a fase superior (sobrenadante) e transferir para tubos de 1,5 mL identificados corretamente;

### Fase Precipitação do DNA genômico

- a) Adicionar 500µL de etanol a 100% gelado (4°C), homogeneizar no vortex e observar a formação de um precipitado. O precipitado é usualmente visualizado em 30 a 60 segundos;
- b) Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- c) Decantar o sobrenadante e adicionar novamente 500µL de etanol a 100% gelado a 4°C;
- d) Centrifugar por 12 minutos a 10.000 rpm em T.A;
- e) Remover o Etanol residual com pipeta e colocar a amostra no banho-seco a 56°C por 10 minutos;

- f) Adicionar 100µL de água destilada estéril em cada tubo (H2Odd)
- g) Quantificar o DNA genômico utilizando o equipamento NanoDrop 2000
- h) Armazenar o DNA purificado a 4°C ou a -20°C.

### **Genotipagem Duffy**

Reagentes Utilizados

#### **Primers**

Sintetizados pela INVITROGEN life technologies.

Solução estoque (1ng/µL)

Para o cálculo utilizamos a concentração em Nmoles de cada primer e multiplicamos por 10 para sabermos a quantidade de água injetável a ser acrescentada na ressuspensão.

As alíquotas foram devidamente identificadas e armazenadas à -20°C

#### **Solução de uso**

Foram diluídos 5 µL da solução de estoque 10 vezes em água injetável.

Exemplo: 5 µL de primer + 45 µL de água injetável.

#### **Enzima taq polimerase.**

Platinum Taq DNA Polymerase

Marca - INVITROGEN

#### **DNTP**

Marca - INVITROGEN

Solução estoque: 100 mM

Solução de uso: 10mM

#### **Reações de PCR.**

Volume final	: 50 µL
Reagentes	Quantidades
Água injetável	33,7 µL (qsp 50 uL)
Buffer	5 µL (sempre 10% do volume final)
Cloreto de Magnésio	3 µL
Primer 1 (forward)	1 µL

Primer 2 (Reverse)	1 $\mu$ L
DNTP	0,8 $\mu$ L
Taq polimerase	0,5 $\mu$ L
DNA extraído	5 uL (Depende da qualidade da extração)

Realizaremos 35 ciclos com as seguintes fases:

95° C por 5 minutos	Desnaturação
94° C por 20 segundos	Desnaturação
62° C por 20 segundos	Anelamento
72° C por 20 segundos	Extensão
72° C por 10 minutos	

### **Reação de RFLP para genotipagem Duffy.**

#### **Enzima de restrição BanI**

Marca: FERMENTAS

Volume final	20 $\mu$ L
Reagentes	Quantidade
Água injetável	5,5 $\mu$ L (qsp 20 $\mu$ L)
Buffer	2,0 $\mu$ L
Enzima de restrição BanI	0,5 $\mu$ L
DNA amplificado (DUFFY)	12 $\mu$ L

Observação:

Incubar a 37°C overnight ou no mínimo por duas horas.

Leitura das bandas em gel de agarose 2%

### **Reação de RFLP para verificação da mutação GATA:**

#### **Enzima de restrição StyI**

Marca: Fermentas

Volume final	20 $\mu$ L
Reagentes	Quantidade
Água injetável.	5,5 $\mu$ L (qsp 20 uL)
Buffer	2,0 $\mu$ L
Enzima de restrição StyI	0,5 $\mu$ L
DNA amplificado (GATA)	12 $\mu$ L

Observação:

Incubar a 37°C overnight ou no mínimo por duas horas.

Leitura das bandas em gel de Poliacrilamida.

### **Preparo do gel de Agarose 1.5%**

1. Em um Erlemeyer pesar 1,5 g de Agarose
2. Completar com TEB 1x para 100 mL ,
3. Tampar o Erlemeyer com plástico (Tipo Magi pac) fazendo um furo no mesmo.
4. Aquecer o Erlemeyer no forno microondas até ferver e ficar transparente.
5. Acrescentar o Brometo de Etídio no Erlemeyer (cerca de 0,7  $\mu$ L para 100 mL).
6. Prepara o suporte de polimerização colocando o pente com a quantidade desejada de poços.
7. Esperar esfriar o Erlemeyer e despejar a agarose a 1,5% no suporte de polimerização.
8. Aguardar a formação do gel e retirar o pente.

As corridas em gel de agarose são para observar se houve amplificação durante o PCR, assim como verificar a qualidade do DNA amplificado, ou seja, se o mesmo está em boa quantidade (Bandas fortes), se não há rastro (não está degradado).

### **Aplicação das amostras no gel de Agarose**

Objetivo: As corridas em gel de agarose são para observar se houve amplificação durante o PCR, assim como verificar a qualidade do DNA amplificado, ou seja, se o mesmo



está em boa quantidade (Bandas fortes), se não há rastro (não está degradado).

1. Colocar o suporte com o gel de agarose dentro da cuba e encher até cobrir com tampão TEB 1x.
2. Em um plástico (Tipo Mag Pac), dispensar pequenas gotas de azul de bromofenol (1-2uL).
3. Pipetar 4  $\mu$ L de branco e DNA, homogeneizar com a gota de azul de bromofenol e dispensar no poço do gel. Deve-se aplicar também 4 uL de Ladder porém este já vem corado
4. Sempre aplicar da seguinte forma: Ladder, branco, DNA's.
5. Correr o gel.

Obs: O DNA pode correr entre 80 e 100 v durante cerca de 5 minutos ou o suficiente para verificar a presença da banda amplificada.

Após a corrida, o gel de agarose está pronto para ser fotografado no sistema de gel documentação.

## **Preparação do gel de Poliacrilamida**

Constituintes

### **1.Acrilamida 40%**

38,5g de acrilamida

1,5g de Metileno Bis acrilamida

100mL de Água Deionizada.

### **2.TEB 10X**

Água Destilada

### **3.Persulfato de amônia (APS) 10%**

1g de Persulfato de amônia (APS)

9mL de Água Destilada

### **4.Temed**

### Gel de Poliacrilamida à 12%

Produto	Quantidade
Acrilamida 40%.	12,8mL /2 = 6,4 mL
TEB 10X	.....4,0mL /2 = 2,0 mL
Água Destilada	24,8 mL /2 = 12,4 mL
Persulfato de Amônia (APS) 10%	400 µL /2 = 200 µL
TEMED	16 µL = 32 µL

### Preparo da Base para receber o Gel

1. Preparar os suportes com as placas de vidro.
2. Prender os suportes nas bases.
3. Preparar o Gel.
4. Encher a placa de vidro com o gel preparado utilizando uma seringa de 10 mL com agulha.
5. Verificar a presença de bolhas e eliminá-las com a agulha.
6. Colocar o pente para a formação dos poços.
7. Aguardar a formação do gel. (Deixar de 1 dia para o outro)
8. Após a formação do gel, verificar, com agulha e seringa, se os poços estão obstruídos.
9. Aplicar as amostras.

### Aplicação de amostras no gel de Poliacrilamida

Encher a cuba de corrida com TEB 1x conforme as marcas na cuba.

### Aplicar as amostras

1. Poços vazios: Encher com azul de bromofenol.
2. Ladder: 5 uL + azul
3. PCR Total: 5 µL + azul
4. Digestão: 10 µ+ azul

Correr a 100 V até o fim do gel.

**Após a corrida**

1. Retirar a lâmina com gel da cuba de corrida.
2. Colocar o gel com a lâmina em uma cuba com Água Destilada ou tampão TEB 1x
3. Retirar o gel da placa.
4. Adicionar 5 $\mu$ L ou 10  $\mu$ L de brometo de etídio e aguardar 5 minutos.
5. Fotografar o gel no sistema de documentação.