
HEMOGLOBINOPATIAS: CIÊNCIA BÁSICA

HEMOGLOBINOPATIAS: CIÊNCIA BÁSICA**001****Avaliação da peroxidação lipídica em portadores do traço falciforme**

Gonçalves RP, Souza IP, Arruda ABL, Dutra LLA, Fonseca JC, Silva AB, Santos BSC, Barbosa MC, Nascimento JL
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil

Introdução: A anemia falciforme caracteriza-se pela presença da hemoglobina S (HbS), que se encontra associada a expressivas taxas de morbidade e mortalidade. A heterozigose para a HbS, denominada traço falciforme, define uma situação clinicamente benigna, em que o indivíduo apresenta as hemoglobinas A e S, uma condição caracterizada por não apresentar usualmente sintomatologia. A presença da mutação para HbS torna os eritrócitos frágeis e com tempo de vida útil diminuído. Com a hemólise, ocorre liberação de produtos de degradação da HbS, como o Fe+2 e Fe+3. Estes atacam a membrana eritrocitária, formando radicais livres. A geração destes radicais amplia as lesões devido aos processos contínuos de peroxidação lipídica, resultando assim, na liberação de alcanos, como o malondialdeído (MDA). **Objetivos:** Este trabalho buscou avaliar a peroxidação lipídica em portadores do traço falciforme. **Metodologia:** Foi realizada a coleta de sangue periférico dos pais das crianças com anemia falciforme atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin. Foram colhidas 70 amostras, sendo 50 dos pais, como portadores do traço falciforme, e 20 de doadores de sangue, como grupo controle. As amostras foram submetidas ao teste de solubilidade e à eletroforese em pH alcalino, para confirmação do traço falciforme, e, em seguida, foram realizadas as dosagens de malondialdeído e de óxido nítrico para avaliação da peroxidação lipídica. **Resultados:** A população do grupo teste, analisada neste estudo, foi caracterizada pelo predomínio de indivíduos na faixa etária de 35 a 42 anos, do sexo feminino (88%) e da etnia parda (82%). A maioria não fumava (84%), não ingeria bebida alcoólica (66%), nem sofria de alguma doença, como hipertensão, diabetes e asma (84%). Já a população do grupo controle foi caracterizada pelo predomínio de indivíduos na faixa etária de 22 a 29 anos, do sexo feminino (55%) e pertencente à etnia parda (50%). A maioria também não fumava (85%), não ingeria bebida alcoólica (65%), nem sofria de alguma doença (80%). O teste de solubilidade e a eletroforese confirmaram o perfil de traço falciforme nas 50 amostras teste e perfil normal nas 20 amostras do grupo controle. Quanto aos parâmetros oxidativos, o grupo teste obteve maiores concentrações de óxido nítrico (4-5 µg) em relação ao grupo controle (2-3 µg). A dosagem do malondialdeído(MDA) não apresentou diferença estatística significativa entre o controle (0,20 nm) e o grupo teste (0,20-0,25 nm). **Conclusão:** Os portadores de traço falciforme, apesar de serem considerados clinicamente e hematologicamente saudáveis, podem apresentar uma condição de peroxidação lipídica, o que comprometeria a estrutura da membrana eritrocitária. O presente estudo sugere a presença de um possível perfil de estresse oxidativo celular, com consequente peroxidação lipídica, fazendo-se, portanto, necessários maiores estudos, utilizando outros marcadores para melhor avaliar a presença desta condição celular nos portadores de traço falcêmico. *Palavras-chave:* Traço Falciforme; Peroxidação Lipídica.

002**Identificação de hemoglobinas com corrida eletroforética semelhante à hemoglobina S no Programa Estadual Triagem Neonatal de MG (PETN-MG)**

Pimentel FS, Viana MB, Ferraz MHC, Mendez del Castillo D, Januario JN, Carmo MH, Perone C, Carvalho NO, Morais IS, Cirino VCMG, Carneiro PGS
Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad) – FM/UFMG, Belo Horizonte-MG, Brasil

Introdução: A doença falciforme é causada por mutação no gene que codifica a cadeia β da globina, resultando em hemoglobina S. Sua incidência em MG é de 1:1.400, segundo o PETN-MG. Há relatos na literatura de, pelo menos, 3 hemoglobinas variantes de cadeia β e 5 de cadeia α, com focalização isoeletrica (IEF) semelhante à da HbS, podendo levar a resultado falso positivo. **Objetivos:** a) diferenciar a HbS de variantes com perfil semelhante na IEF; b) sequenciar variante encontrada em crianças homozigotas; c) verificar relevância clínica dessa variante. **Método:** Foram incluídas 108 crianças triadas pelo PETN-MG (03/1998 - 06/2008). O resultado da 1ª amostra foi indeterminado e do 6º mês vida mostrava Hb na região de S. Foram colhidas novas amostras para repetição da IEF e realização de PCR alelo-específica para HbS. A IEF foi feita em duplicata e os geis lidos por 3 observadores independentes. A análise foi padronizada classificando-se a Hb na região de S como um pouco mais lenta, indistinguível, ou um pouco mais rápida que a Hb S-controle (fração com corrida até -0,5 mm, zero ou até +0,5 mm em relação à posição da HbS-controle, respectivamente). **Resultados:** Das crianças estudadas, 58 haviam sido rotuladas originalmente como tendo Hb AS e 50 Hb "rara". Nas 648 leituras de IEF (108 amostras em duplicata analisadas por três observadores), a Hb variante foi classificada como sendo um pouco mais rápida que a HbS em 56,6%, indistinguível da S em 35,3% e mais lenta em 6,5%. Em 10 leituras (1,6%), o observador não se julgou em condições de emitir uma opinião. A concordância da leitura da IEF de cada observador com ele mesmo (duplicata) foi de 78,4%, 69,2% e 65,7%. Houve concordância tripla na análise da IEF em apenas 26,9% das leituras. A PCR evidenciou que, em apenas 10 casos, tratava-se de HbS. Tanto a criança homozigota como seus pais foram negativos para HbS pela PCR, sendo o resultado discutido em outro tema livre. Nas 10 crianças PCR positivas (60 leituras de gel), a fração da Hb variante foi lida como indistinguível de S em 35% das vezes e como mais rápida que S em 65%. A concordância tripla também foi baixa nestes casos. **Conclusão:** A concordância intraobservador é razoável; já a concordância interobservador é precária. Em apenas 9,3% dos casos a hemoglobina investigada era HbS. Em nenhum desses casos, a Hb variante foi considerada como mais lenta que a S-controle. Esta classificação, portanto, não sugere HbS. Já a leitura de fração aparentemente um pouco mais rápida que a S-controle não pode ser interpretada como Hb variante não-S. Em 90,7% dos casos, constataram-se variantes diferentes da HbS, o que revela o potencial de diagnóstico falso-positivo quando, na triagem neonatal, o perfil da Hb é indeterminado e, no 6º mês de vida, constata-se Hb com corrida eletroforética semelhante à da HbS. Métodos moleculares são imprescindíveis para a elucidação desses casos. O estudo recebe apoio logístico do Nupad-FM/UFMG. *Palavras-chave:* Doença Falciforme; Variantes Região HbS, IEF.

003

Identificação, isolamento e caracterização de marcadores moleculares eritrocitários relacionados à anemia falciforme

Almeida JMMF, Pinto VPT, Costa MN, Albuquerque YMAR, Rogério MEF, Cruz FDAM, Carvalho ACSC
 Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina de Sobral, Brasil

Introdução: A anemia falciforme é a doença hereditária mais prevalente no Brasil, com incidência de 0,1% a 0,3% da população. De acordo com o Ministério da Saúde, o número de doentes é mais prevalente nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo estimado a cada ano o surgimento de setecentos a mil casos novos no país. Anemia falciforme é caracterizada por uma alteração molecular primária, resultado da substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta da hemoglobina. **Objetivo:** Identificar glicoproteína(s) da membrana eritrocitária de pacientes com hemoglobinopatias que possam ser utilizadas como marcador(s) de progressão da doença e correlacionar alterações em glicoproteínas da membrana eritrocitária de portadores de hemoglobinopatias com seu quadro clínico, sua resposta ao tratamento, e consequências, visando identificar critérios que possam ser usados como fatores prognósticos. **Casuística e Método:** Neste trabalho, amostras de sangue periférico e material medular colhidos de 35 pacientes com diagnóstico de hemoglobinopatias atendidos no Serviço de Hematologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará - Hemoce Sobral estão sendo analisadas. **Resultados:** A utilização de lectinas vegetais associadas à fluoresceína tem demonstrado a presença de estruturas membranares relacionadas à célula falcêmica. PAGE-SDS mono e bidimensional estão sendo realizados e os dados até aqui obtidos apontam para um padrão característico de alterações de glicosilação na superfície de células falcêmicas. **Conclusão:** Esperamos conhecer as modificações bioquímicas inerentes ao processo de transformação da célula falcêmica para tentar encontrar um marcador molecular que identifique o eritrócito e assim entender melhor a fisiopatologia da doença e seu tratamento.

Apoio: CNPq, Funcap, UFC.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias; Lectinas; Fluoresceína.

004

Role of diminished cAMP-mediated signaling and increased phosphodiesterase 3A activity in augmented platelet adhesive functions in sickle cell disease

Proença-Ferreira R, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N
 Universidade Estadual de Campinas-SP, Brasil

Sickle cell disease (SCD) is a chronic inflammatory disease that results vaso-occlusive (VOC) events, the principal cause of morbidity in SCD patients. Whilst roles for red cells and leukocytes in the VOC process are well established, the precise role of platelets (PLTs) in SCD inflammatory and VC processes is unclear. **Aim:** Investigated the role of the second messenger, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), in the adhesive properties of PLTs from SCD patients on and off hydroxyurea (HU) therapy. **Methods:** PLTs were separated from healthy control subjects (CON), steady-state SCD patients (SCD) and SCD patients on HU (SCDHU; 20-30 mg/kg/day). Washed PLTs were resuspended in Krebs solution (1.2×10^8 PLT/ml) and their adhesion to fibrinogen (FB/50 μ g/ml) evaluated utilizing static adhesion assays (15 min/37°C). PLTs were also pre-incubated with 1.6 μ M cilostazol (specific inhibitor of

phosphodiesterase 3A-PDE3A) in the presence and absence of thrombin (TB/50 mU/ml). **Results:** PLTs from SCD individuals (SCD PLTs) demonstrate a significantly greater capacity to adhere to FB in vitro in comparison to those of CON (27.2 ± 2.4 , $n=10$; 18.7 ± 2.2 , $n=14$; $p=0.007$), but not in comparison to SCDHU PLTs (21.7 ± 3.5 , $n=13$; $p>0.05$). Levels of cAMP, the reduction of which potentiates PLT activation, were found to be significantly decreased in SCD PLTs compared to those of CON and SCDHU (7.4 ± 0.6 , $n=14$; 10.3 ± 0.9 , $n=13$; 9.1 ± 0.4 pmol/108 PLT, respectively, $n=15$, $P<0.01$ for SCD comp. to CON/SCDHU). TB stimulation is known to considerably reduce intraplatelet cAMP concentrations upon PLT activation. Accordingly, TB stimulation significantly reduced cAMP levels in CON and SCDHU (7.3 ± 0.5 , $n=13$; 6.8 ± 0.4 , $n=15$ pmol/ 10^8 PLTs, respectively, $P<0.01$ comp. to basal), but not SCD PLTs (6.5 ± 0.5 pmol/ 10^8 PLT, $n=14$; $p>0.05$), providing further evidence that PLTs circulate in an activated state in SCD individuals. Notably, PLT cAMP significantly correlated with levels of HbF in SCD individuals ($n=13$, $r=0.610$, $p=0.02$) indicating a direct effect on PLT activation. PDE3A hydrolyzes cAMP, and co-incubation of PLTs with cilostazol (PDE3A inhibitor) significantly diminished the adhesion of SCD PLTs (18.0 ± 2 ; 23.6 ± 2.5 , $n \geq 7$, $p<0.01$), but not CON (14.4 ± 2.2 , 16.1 ± 2.2 ; $n=14$, $p>0.05$) or SCDHU (16.3 ± 2.8 , 18.2 ± 2.9 ; $n=13$, $p>0.05$) PLTs, to FB, when compared with DMSO vehicle-treated PLTs. In contrast, when PLTs were stimulated with TB, cilostazol significantly inhibited the adhesion of CON, SCD and SCDHU PLTs to FB when compared with DMSO vehicle-treated PLTs ($p<0.05$, data not shown). **Conclusion:** Since adherent PLTs play an important role in vascular inflammation, we suggest that the increased adhesive properties of SCD PLT could make an important contribution to the VOC process, and that decreased cAMP-dependent signaling and increased PDE3A activity may mediate augmented PLT adhesive properties in SCD. These results provide insights into the mechanisms involved in PLT activation and adhesion in SCD and suggest novel drug targets worthy of further study.

Palavras-chave: Platelets; Sickle Cell Disease.

005

Aumento dos níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios derivados de plaquetas, sCD40l e sLIGHT, em pacientes com anemia falciforme

Garrido VT, Proença-Ferreira R, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N
 Universidade de Campinas-SP, Brasil

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia hereditária caracterizada por um estado inflamatório crônico com níveis elevados de citocinas inflamatórias e disfunção endotelial acentuada, resultando em anemia hemolítica e eventos vaso-occlusivos. O papel das plaquetas no processo de vaso-occlusão ainda não é muito bem compreendido, mas uma vez ativadas, essas plaquetas secretam e expressam mediadores que induzem uma resposta inflamatória em leucócitos e células endoteliais. **Objetivos:** Este estudo comparou a presença de importantes mediadores inflamatórios liberados por plaquetas, CD40L solúvel (sCD40L) e LIGHT solúvel (sLIGHT) no plasma de indivíduos saudáveis (AA), pacientes falciformes (AF) e pacientes falciformes em terapia com hidroxiureia (AFHU; 20-30 mg/kg/dia). **Método:** O plasma livre de plaquetas (PFP) foi preparado a partir da centrifugação do sangue total por 10 min a 2.000g a 22°C. Em seguida o plasma obtido foi centrifugado mais uma vez por 10 min a 3,000g a 22°C e filtrado por uma unidade filtrante estéril e descartável (Millex GV, Millipore). Os níveis plasmáticos das proteínas plaquetárias (sCD40L e sLIGHT) foram determinados utilizando kits de ELISA específicos (ELISA Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN) seguindo as instruções do fabricante. **Resultados:** Os níveis de sCD40L apre-

sentaram-se significativamente elevados no plasma AF (937.3 ± 201.7 pg/ml, n=21; p<0.01 comp. AA, teste de Kruskal-Wallis) e AFHU (1942.9 ± 521.5 pg/ml, n=12; p<0.001 comp. AA, teste de Kruskal-Wallis) quando comparados com AA (186.2 ± 51.4 pg/ml, n=9). Os níveis de sLIGHT também apresentaram-se significativamente elevados no plasma AF (50.9 ± 16.0 pg/ml, n=15; p<0.01 comp. AA, teste de Kruskal-Wallis) e AFHU (37.8 ± 11.2 pg/ml, n=16; p<0.05 comp. AA, teste de Kruskal-Wallis) quando comparados com os controles (12.8 ± 1.8 pg/ml, n=9). Interessantemente, observou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre os níveis de sCD40L e sLIGHT no plasma dos pacientes AF ($r=0.864$, $p<0.0001$; Correlação de Spearman) mas não entre níveis plasmáticos de sLIGHT/sCD40L e contagem de plaquetas ou HbF ($p>0.05$). **Conclusão:** Este estudo demonstrou que os níveis plasmáticos de sCD40L e sLIGHT estão significativamente mais altos em pacientes com anemia falciforme quando comparados com indivíduos saudáveis. O tratamento com hidroxiureia parece não diminuir os níveis desses mediadores inflamatórios no plasma de pacientes falciformes. Curiosamente há uma correlação positiva entre os níveis de sCD40L e sLIGHT indicando que pode haver uma relação entre a secreção dessas duas proteínas. Tanto sCD40L como sLIGHT foram identificados como potentes mediadores inflamatórios e observados em níveis elevados em uma variedade de doenças que envolvem disfunção endotelial, sendo assim, essas citocinas podem ter um importante papel no processo de vaso-oclusão e também no estado inflamatório crônico encontrado na anemia falciforme.

Apoio financeiro: CNPq/Fapesp.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Plaquetas; Inflamação; Vaso-oclusão.

006

Inflammatory cytokines augment the adhesive properties of neutrophils from sickle cell disease individuals; inhibition of phosphodiesterase 9A reverses this increased adhesion

Miguel LI, Almeida CB, Marcela V, Traina F, Franco-Penteado CF, Saad STO, Costa FF, Conran N
Universidade de Campinas-SP, Brasil

The adhesion of leukocytes to vessel walls may initiate vaso-occlusion in sickle cell disease (SCD). The chronic inflammatory nature of SCD leads to elevation of circulating cytokines, which may contribute to activation of blood cells and consequent adhesion. Nitric oxide (NO) has important inhibitory effects on cell adhesive properties and drugs that enhance NO-cGMP-dependent signaling may hold potential for treatment of various aspects of SCD. **Objectives:** This study aimed to observe the effect of cytokines, found augmented in the plasma of SCD individuals, on the *in vitro* adhesive properties of neutrophils (Neu) from healthy control (CON) and steady-state SCD (SCD) individuals. Furthermore, the effects of BAY736691, an inhibitor of the cGMP-hydrolyzing enzyme, phosphodiesterase 9A (PDE9A), on non-stimulated and cytokine-stimulated cell adhesion were determined. **Methods:** Neu were isolated from peripheral blood of CON and SCD individuals. Cell adhesion (5×10^6 Neu/ml RPMI) to immobilized fibronectin (FN; 20 µg/ml) was assessed using static adhesion assays (30 min, 37°C, 5% CO₂) in the presence or absence of physiologically-relevant concentrations of cytokines IL-8 (100-500 ng/ml), TNF-alpha (0.1-1 µg/ml) and GM-CSF (1-100 ng/ml) and/or in the presence or absence of BAY736691 (60 µM). **Results:** As previously shown, SCDneu have a greater adhesion to FN than CONneu (20.7 ± 1.3%; 16.1 ± 1.5%, respectively, n=19,20, p=0.03). Stimulation of cells with all three cytokines significantly augmented both CONneu adhesion to FN and further increased SCDneu adhesion: IL-8 (200 ng/ml) increased CONneu adhesion to

26.6 ± 2.8% (n=7, P=0.02) and SCDneu adhesion to 32.5 ± 3.5% (n=5, p=0.02); TNF-alpha (500 ng/ml) increased CONneu adhesion to 25.0 ± 5.5% (n=8, P<0.05) and SCDneu adhesion to 29.2 ± 3.0% (n=10, p<0.05) and GM-CSF (100 ng/ml) significantly augmented CONneu adhesion to 20.6 ± 1.9% (n=8, P<0.05) and SCDneu adhesion to 25.2 ± 2.2% (n=7, p<0.05). Co-incubation of both CONneu and SCDneu with BAY736691 significantly reduced their adhesions to FN (CONneu adhesion reduced to 13.5 ± 2.2% for 60 µM BAY736691, n=19, P<0.01) (SCDneu adhesion decreased to 15.1 ± 1.2% for BAY736691, n=20, P<0.001). Furthermore, BAY736691 significantly inhibited CONneu (Data not shown) and SCDneu adhesion induced by IL-8 (32.6 ± 3.5% reduced to 10.5 ± 2.4% with BAY736691, p<0.001, n=6), by TNF-alpha (29.2 ± 3.1% reduced to 23.1 ± 3.7% with BAY736691, p<0.05, n=9) and by GM-CSF (25.2 ± 2.2% reduced to 15.4 ± 1.9%, p<0.05, n=8). Circulating inflammatory cytokines may play a role in the induction of leukocyte adhesive properties in SCD. Data suggest that elevation of intracellular cGMP may be an important approach for reducing SCD leukocyte properties, even in an inflammatory environment. PDE9A is highly expressed in hematopoietic cells and the inhibition of this enzyme, with consequent augmentation of cGMP, may represent a tissue-specific therapeutic drug target worthy of further *in vitro* and *in vivo* studies as a therapy for SCD.

Apoio: Fapesp.

Palavras-chave: Leucócitos; Anemia Falciforme; Fosfodiesterase; Inflamação.

007

Sickle cell disease serum has both apoptotic and anti-apoptotic effects on leukocytes; role for reactive oxygen species generation and cytokines

Almeida CB, Pereira FG, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF, Zorzetto NC
Hemocentro – Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp-SP, Brasil

Objectives: High leukocytes counts exacerbate inflammatory and vaso-occlusive processes in SCD. Inhibition of Neu apoptotic pathways in SCD may contribute to leukocytosis. This study investigated whether alterations in SCDneu death pathways are the result of shifts in cell turnover or whether factors present in SCDser influence this process. **Methods:** Serum from 18 individuals was mixed to prepare pool from the groups; control individual (CON), steady-state SCD patients (SCD) and SCD patients on hydroxyurea therapy (SCDHU; 20-30 mg HU/kg/day). Isolated Neu (4×10^6 cells/ml) were cultured in the presence of serum (10% v/v) for 16h, 37°C, 5% CO₂, in RPMI. Neu were also cultured in the presence of Vitamin C (100 µg/ml), N-acetyl cysteine (NAC-100 µg/ml) or Superoxide dismutase (SOD-300 U/ml). Flow cytometry was used for Neu immunophenotyping, evaluation of apoptosis detection of annexinV binding and determination of reactive oxygen species (ROS). **Results:** SCDneu cultured in the presence of CONser present delayed apoptosis compared to CONneu cultured with CONser (42 ± 4% comp. to 54 ± 3% cells in apoptosis, N ≥ 13; P=0.02). Since shifts in cell turnover could explain changes in apoptotic rate, immunophenotypic expressions of CON, SCD and SCDHU Neu were determined to compare the maturity of populations (96 ± 1%; 95 ± 1%; 97 ± 1% mature cells [CD16pos/CD13pos/CD15high] for CON, SCD and SCDHU, respectively, N ≥ 9; P>0.05). As alterations in cell maturation do not appear to mediate alterations in SCDneu apoptotic rate, the effects of SCDser on Neu apoptosis were investigated. CONneu, when cultured in the presence of SCDser, demonstrated a higher number of apoptotic cells (56 ± 5%; N=8), compared to CONneu cultured with CONser (44 ± 4%; N=8; P<0.004 comp. to SCD) or SCDHUser (45 ± 5%; N=8;

$P < 0.0001$ comp. to SCD). Intracellular ROS generation may induce Neu apoptosis by caspase-independent pathways. SCDser induced a higher production of ROS in CONneu, comp. to CONser after 2h of culture ($58 \pm 8\%$; $39 \pm 3\%$; $N=18$; $P=0.02$). To determine whether ROS may contribute to the apoptotic processes observed, CONneu were cultured in the presence of pooled serum and VitC, NAC or SOD. They reduced apoptotic CONneu cultured in the presence of SCDser ($53 \pm 3\%$ reduced to $50 \pm 2\%$ with VitC, $P < 0.05$, $N=11$; $50 \pm 3\%$ reduced to $46 \pm 3\%$ with NAC, $P < 0.05$, $N=9$). SOD markedly decreased the rate of apoptotic CONneu incubated with all pooled serum ($45 \pm 3\%$ reduced to $29 \pm 2\%$ CON, $P=0.003$, $N \geq 8$; $53 \pm 4\%$ reduced to $35 \pm 2\%$ SCD, $P=0.005$, $N \geq 8$; 43 ± 3 reduced to $30 \pm 2\%$ SCDHU, $P=0.006$, $N \geq 8$), indicating that superoxide production appears to contribute to SCDser induced Neu apoptosis. **Conclusions:** An understanding of the mechanisms controlling leukocyte death may identify molecular targets for decreasing leukocyte counts in SCD. Data indicate that alterations in death signaling pathways may be inherent to SCDneu and may be subject to modulation by a complex balance of both anti and pro-apoptotic factors contained in serum.

Financial support: Fapesp.

Palavras-chave: Sick Cell Disease; Neutrophils; Apoptosis, ROS.

008

Nova técnica para investigar a ação da hidroxiureia (HU) sobre a reologia do sangue SS

Nakamura Filho A, Cardoso AV

Cetec – Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Brasil

Objetivos: Desenvolver nova técnica para medir a agregação eritrocitária do sangue humano e testá-la em amostras de sangue de portadores de anemia falciforme com e sem a adição de hidroxiureia. **Métodos:** O protocolo proposto não envolve a criação de um novo equipamento, mas tão somente a utilização de um já existente, o leitor de microplacas, mais conhecido como leitor de ELISA, equipamento largamente utilizado em atividades de biociências e biomédicas. O equipamento ELISA é, de fato, um fotômetro. As atividades experimentais envolveram a montagem de programa de coleta de amostras, ensaios de viscosidade e ensaios com sangue de doadores e de pacientes com doença falciforme, utilizando o equipamento leitor de microplacas. Em seguida, foi investigado o efeito da adição de hidroxiureia em amostra de sangue SS. Por se tratar de uma nova técnica experimental, especial atenção foi destinada aos aspectos metrológicos. Como a agregação eritrocitária é um fenômeno cinético, algumas variáveis mereceram maior atenção, como temperatura de ensaio, volume de sangue no micropoço, hematócrito e tipo de pipeta (micropipeta multicanal eletrônica e monocanal de deslocamento positivo) para injetar a amostra no micropoço. **Resultados:** Os resultados que apresentamos nesse trabalho mostram que, com o leitor de microplacas, as três etapas físicas do processo de agregação do sangue humano são claramente delineadas. A técnica proposta parece ter sensibilidade suficiente para indicar alterações na tensão de cisalhamento (em Pa) com que são aplicadas as amostras. A diferença nas curvas obtidas com dois tipos diferentes de pipetas é devido à magnitude da tensão cisalhante exercida por cada uma, no momento da injeção da amostra nos micropoços do leitor. As curvas do sangue SS apresentaram maior absorvância em relação ao sangue normal e há ausência do "pico" característico do sangue normal. Existe grande diferença na agregabilidade das hemácias SS em relação às hemácias normais, de acordo com as fotomicrografias obtidas em microscópio óptico. Diferenças entre os ensaios com sangue normal, SS e SS tratado com HU foram observadas. São apresentadas as curvas das médias dos valores de ensaios realizados com sangue nor-

mal (doador), sangue SS e SS tratado com HU. Notou-se que a curva de agregação do sangue normal difere muito da curva do sangue SS sem qualquer tratamento. Após o tratamento do sangue SS com HU, a curva se aproxima da curva do sangue normal. São apresentadas fotomicrografias de amostra de sangue SS antes e após a adição de HU e é possível observar a diferença na agregabilidade das hemácias antes e após o tratamento. **Conclusões:** A investigação sobre a ação da hidroxiureia diretamente sobre a deformabilidade e agregabilidade de hemácias SS pode indicar novos mecanismos de ação da droga sobre a membrana da hemácia ainda não reportados.

Esse projeto foi financiado pela Fapemig (EDT 3299/6).

Palavras-chave: Falciforme; Reologia; Agregação; Leitor.

009

Hemoglobina Stanleyville II associada à deleção do gene alfa 3.7 do tipo I em homozigose: estudo de duas famílias

Pimentel FS, Viana MB, Ferraz MHC, Mendez del Castillo D, Januário JN, Perone C, Carvalho NO, Carmo MH

Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (Nupad) – FM/UFMG – Belo Horizonte, Brasil

A doença falciforme é causada por mutação no gene que codifica a cadeia β da globina, resultando em hemoglobina S. Sua incidência em MG é de 1:1.400, segundo o PETN-MG. Há relatos na literatura de, pelo menos, 3 hemoglobinas variantes de cadeia β e 5 de cadeia α , com focalização isoelétrica (IEF) semelhante à da HbS, o que pode gerar resultado falso positivo. **Objetivos:** a) Sequenciar variantes identificadas em uma família da região de Ouro Preto/MG (OP) e outra da região do Lago de Furnas (LF), ambas em homozigose nas duas crianças triadas; b) verificar relevância clínica dessas variantes. **Métodos:** Foram colhidas novas amostras para repetição da IEF e realização de PCR alelo-específica para HbS. Em seguida, foi realizada PCR multiplex para o diagnóstico das deleções mais comuns causadoras de alfa-talassemia O sequenciamento do gene da beta globina foi feito em um caso (OP) e o da alfa globina em ambos. Utilizou-se como referência para o gene α a sequência NCBI NG_000006.1. **Resultados:** As duas famílias não possuem parentesco conhecido entre elas. A história familiar da criança OP revelou que os pais são primos, mas não sabem informar em que grau. Os perfis das amostras de RN foram indeterminados; os do 6º mês de vida e os das amostras de repetição evidenciaram Hb na região de S. As PCR alelo-específicas para Hb S foram negativas. O sequenciamento da β globina não evidenciou mutações na criança OP e em seus pais. O PCR multiplex para alfa talassemia revelou deleção de dois genes para alfa globina nas duas crianças ($-\alpha 3.7/-\alpha 3.7$) e de apenas um gene em seus pais ($\alpha/\alpha 3.7$). O sequenciamento do gene híbrido $\alpha 3.7$ em ambas as crianças identificou uma mutação na terceira posição do códon 78 (AAC>AAA; Asn>Lys), em homozigose (Hb Stanleyville II). Identificou-se, igualmente, que a deleção 3.7 presente era do tipo I (crossover 5' do sítio da enzima de restrição Apa-I, no intron 2 do gene alfa1 primitivo), também em homozigose. Em todos os genitores foram detectadas as mesmas alterações, em heterozigose. O hemograma da criança OP revelou Hb 11,4 g/dL, VCM 65 fL, HCM 20,1 pg, CHCM 30,9 g/dL e contagem de reticulócitos 0,3%; na hematoscopia, discreta poiquilocitose, anisocitose e moderada microcitose. Os exames da cinética de ferro foram todos normais. A pesquisa de drepanócitos foi negativa. **Conclusão:** As crianças estudadas apresentam alfa-talassemia por presença da deleção 3.7 (tipo I) associada à mutação Stanleyville II (substituição da asparagina por lisina), em homozigose ($\alpha 2\text{Sta}\beta 2$). Os pais são heterozigotos. Os dados indicam que a criança de OP apresenta tão somente manifesta-

ção hematológica correspondente à alfa talassemia com dois genes deletados.

O estudo recebe apoio logístico do Nupad-FM/UFMG.

Palavras-chave: Stanleyville II; Alfa-talassemia

010

Estresse oxidativo em portadores de anemia falciforme: perfil leucocitário e relação com uso de medicação específica

Belini Júnior E, Zamarro PJA, Torres LS, Silva DGH, Cançado RD, Domingos CRB

Unesp – Ibilce/LHGDH – São Paulo, Brasil

A anemia falciforme (AF) é uma afecção genética caracterizada pela homozigose da hemoglobina (Hb) S. Em condições de hipóxia, há a polimerização dessa Hb, levando a múltiplas alterações nas células. Eritrócitos falcizados estão sob constante estresse oxidativo, um dos vários processos envolvidos na fisiopatologia da AF. Para o tratamento da AF, tem sido utilizada a hidroxiureia (HU), cujo efeito relaciona-se ao aumento dos níveis de HbF, diminuição da expressão de moléculas de adesão e do número de granulócitos, monócitos e plaquetas, que, quando elevados, representam fatores de risco para a vaso-oclusão. Com a finalidade de manter a HbS em níveis baixos, a transfusão de hemácias é uma prática bastante comum em pacientes com AF, e sua associação com a quelação do ferro previne o acúmulo de ferro no organismo e os danos teciduais decorrentes do excesso desse metal. **Objetivo:** Avaliar a relação do estresse oxidativo com o perfil leucocitário e o uso de medicação específica para o tratamento da AF. **Método:** Foram analisadas 35 amostras de sangue periférico de pacientes com AF determinada molecularmente, colhidas após consentimento. O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Dados hematológicos e informações sobre o tratamento foram obtidos por consulta aos prontuários e ao banco de dados do hospital. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statística 7.0. **Resultados:** Os pacientes foram separados em quatro categorias: 1- pacientes sob quelação de ferro por deferisirox-DFX; 2- pacientes em uso de DFX e HU; 3- pacientes sem medicação específica e 4- pacientes sob o uso de HU. Os valores de TBARS estavam acima da faixa de normalidade e, entre os grupos, houve diferença significativa ($p=0,028$), sendo a peroxidação lipídica maior no grupo 3. Os valores de TEAC entre os pacientes com AF não apresentaram diferença significativa, mas comparando com os indivíduos sem hemoglobinopatias, a capacidade antioxidante foi maior ($p=0,001$). Não houve diferença entre os grupos no número de leucócitos totais, mas os valores estavam acima da normalidade nos grupos 1 e 4. Na contagem diferencial de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, em todos os grupos estavam dentro da normalidade e não apresentaram diferença entre si. A porcentagem de monócitos estava acima dos valores de referência em todos os grupos e houve diferença entre eles ($p=0,003$), sendo os valores mais elevados nos pacientes do grupo 3. **Conclusões:** Portadores da AF apresentam aumento do estado oxidativo e a melhor resposta de tratamento foi observada na associação da terapia transfusional com a quelação de ferro e o uso de HU. O aumento de pró-oxidantes pode explicar o aumento das células de defesa, como os monócitos. Já a capacidade antioxidante nesses pacientes não foi suficiente para neutralizar as espécies reativas de oxigênio que geram peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo; Leucograma; Medicação; Tratamento.

011

Presença de haplótipos beta S e talassemia alfa em pacientes com anemia falciforme no sul do Brasil

Lindenau J, Wagner S, Gonzalez T, Santin AP, Azevedo L, Castro SM, Hutz MH, Zaleski C

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Introdução: A anemia falciforme é causada pela homozigose da hemoglobina S (Hb S), que é o resultado de uma única mutação no sexto códon do gene da globina beta. Os genes que codificam a cadeia beta da globina encontram-se em um agrupamento que inclui cinco genes expressos diferencialmente ao longo do desenvolvimento e também dois pseudogenes. Diversos polimorfismos foram descritos neste agrupamento e é observada a existência de haplótipos que, associados com fatores genéticos (tais como a talassemia alfa e níveis de hemoglobina fetal) e ambientais, contribuem para a variabilidade clínica da anemia falciforme. Cinco haplótipos principais são descritos, denominados de acordo com suas diferentes origens geográficas: Bantu, Benin, Senegal, Camarões e Árabe-indiano. As talassemias alfa se caracterizam pela diminuição ou ausência da produção de cadeias alfa-globínicas como resultado de mutações de ponto ou deleções nos genes da globina alfa. A mutação mais frequente em populações mediterrâneas e africanas é -alfa3,7. **Objetivo:** Determinar a prevalência destes haplótipos e das principais deleções que causam a talassemia alfa em 110 pacientes com anemia falciforme no Estado do Rio Grande do Sul. **Método:** A amostra é constituída de indivíduos encaminhados para confirmação diagnóstica pelo Serviço de Referência em Triagem Neonatal do Estado do Rio Grande do Sul ou por médicos e serviços de saúde. O DNA foi extraído pelo método de *salting out* a partir de sangue periférico; a determinação dos haplótipos foi realizada por PCR-RFLP, através da análise de cinco sítios polimórficos. As deleções que determinam a talassemia alfa (-alfa3,7, -alfa4,2, -alfa20,5, -SEA e -MED) foram identificadas através de PCR-multiplex. **Resultados:** O haplótipo Bantu foi o mais frequente (67,3%), seguido pelos haplótipos Benin (25%), Camarões (0,9%) e Senegal (0,5%). Além disso, 6,4% dos cromossomos não apresentaram padrões de clivagem correspondentes aos haplótipos conhecidos, sendo, por isso, considerados atípicos. **Conclusão:** Estes resultados estão de acordo com as frequências haplotípicas encontradas na população brasileira. Com relação à talassemia alfa, foi encontrada apenas a deleção -alfa3,7, com uma frequência alélica de 0,14. Esta frequência é semelhante à encontrada em afrodescendentes, não havendo, portanto, um aumento da frequência desta característica nestes pacientes.

Apoio financeiro: CNPq, Instituto do Milênio, Pronex e Fapergs.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Haplótipos; Talassemia.

012

Co-herança entre síndrome de Gilbert e anemia falciforme e beta talassemia

Azevedo L, Wagner S, Zaleski C, Santin AP, Castro SM

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

Introdução: Vários fatores têm sido descritos como moduladores sobre os níveis de bilirrubina em pacientes com hemoglobinopatias. Dentre estes fatores podemos citar a síndrome de Gilbert, que se caracteriza por um quadro de hiperbilirrubinemia benigna não conjugada. A configuração normal do gene UGT1A1, codificador da enzima glicuronosiltransferase, possui 6 repetições dinucleotídicas TA na região promotora. Os alelos mutantes podem apresentar 5, 7 ou 8 repetições TA. A literatura relata que a presença

em homozigose para a variante TA7, em associação com síndromes hemolíticas, como a anemia falciforme e a beta talassemia estão associadas ao aumento da bilirrubina e incidência da colestase nestes pacientes, sendo ainda descritas diferentes concentrações de bilirrubina na presença dos alelos TA5 e TA8. **Objetivo:** Estabelecer a co-herança entre síndrome de Gilbert e anemia falciforme e beta talassemia. **Casuística e Método:** Foi estabelecida a distribuição dos genótipos da UGT1A1 em 126 pacientes anêmicos falciformes, 117 beta talassêmicos e 232 indivíduos controle de um banco de DNA existente no Laboratório de Hemoglobinopatias da Faculdade de Farmácia, UFRGS. A amplificação das variantes alélicas da região promotora do gene UGT1A1 foi feita pela Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando *primer* marcado com fluoróforo (FAM) e os fragmentos foram separados por eletroforese capilar no aparelho ABI3130, Applied Biosystems®. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças nas frequências alélicas e genotípicas nos grupos falciforme e beta talassêmico quando comparados ao grupo controle ($x^2=0,194$). Quando estratificados por genótipos de menor (TA6/TA6), TA6/TA7) e maior risco (TA5/TA5, TA5/TA6, TA5/TA7, TA6/TA8, TA7/TA7, TA7/TA8) encontramos uma tendência ($x^2=0,060$) ao aumento destes polimorfismos em pacientes com anemia falciforme. **Conclusões:** Nossos resultados são similares aos relatos encontrados na literatura, que demonstram uma frequência aproximada de 12,5% para o genótipo TA7/TA7 na população. Estes achados demonstram a necessidade da avaliação desses genótipos para diferenciação das hiperbilirrubinemias e para avaliação da variabilidade clínica nestes grupos de pacientes. **Apoio financeiro:** CNPq.

Palavras-chave: Hemoglobinopatias; UGT1A1; Síndrome Gilbert.

013

Ortopedia funcional dos maxilares e fonoaudiologia – Relato de um caso

Cavalcanti WES, Pinto JB, Motta Jr EA, Carvalho V
IEHASC/Hemorio – Rio de Janeiro, Brasil

As síndromes falcêmicas integram um grupo de doenças em que há herança do gene beta globina. A anemia de células falciformes homozigota (Hbss) é a mais comum. A hemoglobina desoxigenada polimeriza-se em fibras longas. Os eritrócitos falcizam-se e podem ocluir diferentes regiões da microcirculação ou grandes vasos, causando infarto de vários órgãos. No estado do Rio de Janeiro, a cada 1.200 nascimentos 01 (um) é portador da doença falciforme. É sabido que a maioria dos pacientes com doença falciforme apresenta disfunções respiratórias e mastigatórias, o que acarreta a má oclusão e o aumento do número de cáries. Faz-se necessário a correção destas disfunções através de um tratamento ortopédico funcional dos maxilares e fonoaudiológico. Trata-se de um projeto pioneiro em que se busca o aprimoramento das funções respiratórias e mastigatórias destes pacientes, além do equilíbrio estético facial, físico e mental. O nosso objetivo é proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes com doença falciforme de acordo com as diretrizes da Política Nacional de Atendimento Integral às Pessoas com Doença Falciforme do Ministério da Saúde. Paciente: A.C.G. - matrícula: 021703-4. Data de Nascimento: 13/05/2001. Início do Tratamento: 09/11/2007. Diagnóstico Médico: Doença Falciforme (SS); Hábitos viciosos: morder os lábios. Diagnóstico: Classe I de Angle; Compressão Maxilar; Giroversão (31 e 41). Diagnóstico Fonoaudiológico: Alterações do Sistema Estomatognático (por hipo ou hiper função da musculatura): - Hipertonia dos lábios superior e inferior; - Língua em repouso no soalho bucal. Tratamento Realizado: Ortopedia; Fonoaudiologia; Fisioterapia. Com o uso de aparelho funcional dos maxilares, podemos corrigir as deformações estéticas, bem como os vícios de respiração e fononização, proporcionando uma

melhor oxigenação do paciente. Aparatologia: Ortodontia móvel - não existe necessidade de alteração postural de mandíbula. **Palavras-chave:** Ortopedia Móvel dos Maxilares.

014

Relacionamento normal de primeiros molares; mordida cruzada

Cavalcanti WES, Pinto JB, Motta Jr EA, Ferreira VC
IEHASC/Hemorio, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

No estado do Rio de Janeiro, a cada 1.200 nascimentos 01 (um) é portador da doença falciforme. É sabido que a maioria dos pacientes com doença falciforme apresenta disfunções respiratórias e mastigatórias, o que acarreta à má oclusão e o aumento do número de cáries. Faz-se necessário a correção destas disfunções através de um tratamento ortopédico funcional dos maxilares e fonoaudiológico. Trata-se de um projeto pioneiro em que se busca o aprimoramento das funções respiratórias e mastigatórias destes pacientes, além do equilíbrio estético facial, físico e mental. O nosso objetivo é proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes com doença falciforme de acordo com as diretrizes da Política Nacional de Atendimento Integral às Pessoas com Doença Falciforme do Ministério da Saúde. Paciente: K.C.O.F. - matrícula: 021794-8; Data de Nascimento: 05/06/2001; Início do Tratamento: 27/05/2008; Diagnóstico Médico: Doença Falciforme (SS); Hábitos viciosos: Chupeta até 20/07/08; Diagnóstico: Classe I de Angle; Mordida Cruzada (53/83 e 63/73); Mordida Aberta Anterior. Diagnóstico Fonoaudiológico: Alterações do Sistema Estomatognático (por hipo ou hiper função da musculatura): - Língua alargada, com pouca função; - Língua em repouso no soalho bucal; - Anteriorização da língua; - Lábios hipotônicos, sendo o inferior evertido. Com o uso do aparelho de ortopedia móvel dos maxilares o paciente apresentou admirável melhora no seu estado geral.

Palavras-chave: Respiração e Aparelho Móvel.

015

Implantação da técnica de diagnóstico molecular para hemoglobinopatias S no Laboratório de Biologia Molecular do UnilesteMG

Gomes FD, Castro RD, Moraes e Silva RM, Valadão AF
Centro Universitário do Leste de Minas Gerais – UnilesteMG, Brasil

Introdução: Hemoglobinas anormais e suas diferentes combinações estão amplamente distribuídas na população mundial. Mutações pontuais que culminam na troca de uma base nitrogenada são as mais simples alterações que causam instabilidade na hemoglobina. A diferença entre a hemoglobina A (normal) e a hemoglobina S está na sequência primária de aminoácidos, determinada pela sequência de DNA. Na hemoglobina S ocorre a troca de uma adenina por uma timina no cromossomo 11, levando à troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina na cadeia β da hemoglobina. No Brasil existe uma prevalência elevada de homozigose e heterozigose para o gene da HbS. O diagnóstico de patologias geneticamente herdadas através de análise do DNA tem se tornado cada vez mais frequente e preciso. A implantação da técnica de diagnóstico molecular para hemoglobinopatias S a ser realizada no presente estudo será de grande importância para o aconselhamento genético em indivíduos homozigotos e heterozigotos para doenças falcêmicas. **Objetivo:** O trabalho tem como objetivo a implantação e avaliação do diagnóstico molecular de hemoglobinopatia S em homozigose (SS) e heterozigose (?S), visando a padronização de tal diagnóstico no Laboratório de Biologia

Molecular do UnilesteMG, e a determinação da ocorrência de hemoglobina S em casais sem filhos e sobrinhos nascidos após 2001. **Metodologia:** Foram utilizados dez indivíduos para avaliar a presença da mutação, analisando amostras de DNA extraído do sangue total colhido em EDTA. A técnica de PCR/ RFLP foi utilizada para a análise. Foram utilizados os *primer* reverso 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC -3' e o *primer* direto 5'-ACACAACGTGTCTCACTAGC -3' para a PCR e a enzima específica Dde I. Visualizaram-se as bandas características dos genótipos através da eletroforese do produto digerido em gel de acrilamida a 6%. **Resultado e Discussão:** Foi encontrado um indivíduo dentre os dez avaliados com a mutação em heterozigose e o mesmo não possuía conhecimento sobre a mutação ou sobre anemias de origem genética na família. A metodologia utilizada pela pesquisa permitiu apenas a identificação da HbS nos pacientes pesquisados. Em indivíduos homozigotos para a HbS, a identificação é característica, aparecendo apenas um fragmento com 110pb. Em indivíduos heterozigotos para a HbS aparecem três fragmentos, sendo uma banda de 110pb, correspondente a HbS, e as outras duas bandas apresentam 54 e 56pb, indiferenciáveis no gel, porém, não se pode garantir qual a outra Hb que o indivíduo possui associada a S. **Conclusão:** Os resultados obtidos evidenciaram a eficácia da técnica no diagnóstico, com a caracterização dos pacientes perante a mutação. Sua boa reprodutibilidade e segurança, em relação aos demais métodos, permitiram a implantação da técnica com sucesso, possibilitando padronizar um teste diagnóstico baseado na amplificação gênica e na digestão enzimática no laboratório que poderá, futuramente, prestar serviços de diagnóstico para este tipo de hemoglobinopatia. **Palavras-chave:** Diagnóstico Molecular; Anemia Falciforme.

016

Influência do tratamento com hidroxiureia nas propriedades adesivas, quimiotáticas e degranulação dos eosinófilos em pacientes com anemia falciforme

Pallis FR, Conran N, Fertrin KY, Saad STO, Franco-Penteado CF, Costa FF
Unicamp-SP, Campinas-SP, Brasil

O estado inflamatório crônico tem um papel essencial no processo de vaso-oclusão na anemia falciforme (AF), sendo os leucócitos considerados as células que iniciam este processo. Sabe-se que os neutrófilos de pacientes com AF estão ativados na circulação, apresentando alterações funcionais, como o aumento da expressão de moléculas de adesão, das propriedades adesivas e quimiotáticas. Além dos neutrófilos, os eosinófilos (EOs) também podem participar do processo de vaso-oclusão na AF, uma vez que os EOs estão em maior número no sangue periférico e apresentam propriedades adesivas aumentadas em pacientes com AF. No entanto, o papel dos EOs na fisiopatologia da AF e o efeito do tratamento com hidroxiureia (HU) nas propriedades funcionais destas células ainda não estão bem elucidados. **Objetivos:** Avaliar as propriedades adesivas, a capacidade quimiotática e a degranulação dos EO de pacientes com AF e o efeito do uso de HU. **Método:** Os EOs foram isolados do sangue periférico de pacientes com AF sem o uso de HU ($n \leq 9$), em uso de HU ($n \leq 10$) e controles sadios ($n \leq 10$) através da separação das células por gradiente de Percoll seguida de separação imunomagnética. A adesão dos EOs à fibronectina foi avaliada por técnica de adesão estática, a migração dos EOs foi determinada em 96-multiwell ChemoTx chamber e a degranulação por detecção da atividade da peroxidase eosinofílica no sobrenadante. **Resultados:** O número absoluto de EOs no sangue periférico dos pacientes com AF tratados com HU foi menor que nos pacientes sem HU ($0,21 \pm 0,04$ vs $0,6 \pm 0,16$ respectivamente, $P=0,008$). A adesão basal dos EOs

dos pacientes com AF foi significativamente maior que dos controles sadios ($18,4 \pm 2,7$ vs $10,2 \pm 1,5$, respectivamente, $P=0,017$). Pacientes tratados com HU apresentaram redução da adesão dos EOs quando comparados com os pacientes sem HU ($10,2 \pm 1,5$, $P=0,013$). Foi observado um aumento na capacidade quimiotática dos EOs de pacientes com AF quando comparados com os controles sadios ($13,7 \pm 1,9$ vs $3,65 \pm 0,72$, respectivamente, $P=0,0003$). Não houve diferença significativa na capacidade quimiotática dos EOs de pacientes com AF tratados com HU em relação aos pacientes sem HU ($9,99 \pm 1,36$, $P>0,05$). EOs de pacientes com HU apresentaram menor capacidade quimiotática que EOs de pacientes sem HU ($0,16 \pm 0,05$ vs $0,40 \pm 0,04$, respectivamente, $P=0,004$). A degranulação dos EOs de pacientes com AF tratados com HU também foi significativamente menor quando comparados aos controles sadios ($0,28 \pm 0,02$, $P=0,024$). **Conclusões:** EOs de pacientes com AF apresentam maior capacidade quimiotática e de degranulação. A terapia com HU associa-se à redução da adesão e da degranulação dos EOs desses pacientes, mas não possui efeito sobre capacidade quimiotática dessas células. Esses dados sugerem que, além dos neutrófilos, os EOs também podem ter papel importante na fisiopatologia da doença.

Apoio: Fapesp.

Palavras-chave: Eosinófilos; Anemia Falciforme; Inflamação.

017

Resultado do tratamento dos pacientes do Hemório com sobrecarga de ferro transfusional após seis meses do uso de Deferasirox

Cunha CAS, Nobrega TCO, Cerqueira ECR, Olival M, Queiroz AMM, Pessoa V, Moura P, Lobo CLC
Hemório – Rio de Janeiro, Brasil

Objetivos: Nas hemoglobinopatias em que a necessidade transfusional é elevada, ocorre a sobrecarga de ferro, que se acumula a níveis tóxicos em órgãos, resultando em disfunção principalmente do fígado e coração, com aumento da morbidade e redução da sobrevida. Nestes casos, o uso de quelantes de ferro faz-se necessário. O objetivo deste trabalho é descrever nossa experiência com o quelante de ferro oral deferassirox (DFX) em pacientes com sobrecarga de ferro transfusional no Hemório, no período de seis meses. **Método:** Foram avaliados pacientes com hemoglobinopatias tratados com DFX em relação a sexo, idade, diagnóstico hematológico, história transfusional, valores de ferritina pré e após tratamento por seis meses, dose do DFX e efeitos adversos (EA). **Resultados:** Oito pacientes (3M, 5F; média de idade de $17 \pm 10,7$ anos, com intervalo de 37 a 3 anos de idade), dois com talassemia maior e seis com doença falciforme e todos transfundidos com mais de 40 unidades (U) de concentrados de hemácias, cinco com mais de 2U transfusões/mês. A média dos valores de ferritina pré-DFX foi de 5959 ± 3523 $\mu\text{g/L}$ e, após seis meses de DFX, foi de 4621 ± 2377 $\mu\text{g/L}$, mas não houve diferença estatística significativa entre os níveis de ferritina nestes primeiros seis meses. A média da dose utilizada foi de $23,75 \pm 6,94$ mg/kg/dia. O mais comum EA foi o aumento das transaminases, e apenas um apresentou aumento de creatinina de 30% em relação ao valor basal, mas não ultrapassou o limite da normalidade. Em nenhum dos pacientes houve a necessidade da interrupção do tratamento, e apenas um necessitou de redução da dose pelo aumento das transaminases em cinco vezes acima do normal. **Conclusão:** DFX foi bem tolerado entre nossos doentes, sem efeitos adversos graves e não houve diferença estatística significativa nos níveis de ferritina após seis meses com o uso de DFX, como já observado na literatura, por ser um tratamento a longo prazo e por estar dentro do período de ajuste de dose. Maior tempo observacional é necessário para melhor análise dos resultados.

Palavras-chave: Quelante; Sobrecarga de Ferro.

018

Frequência de portadores de hemoglobinopatias em ambulatórios de anticoagulação oral e onco-hematologia

Kang HC, Cardoso C, Machry L
Universidade Federal Fluminense, Brasil

Justificativa: Temos em nossa população cerca de 4% de portadores de hemoglobinopatias e não sabemos se isso pode influenciar na expressão das doenças crônico-degenerativas ou outras alterações que podem se manifestar com o avançar da idade. Poderiam ter alguma influência na manifestação das doenças crônico-degenerativas e se algum ambulatório tem maior frequência destes portadores são da hemoglobina S? **Objetivo:** Avaliar a frequência de portadores de hemoglobinopatias em ambulatórios de anticoagulação oral e onco-hematologia. **Material e Método:** O projeto foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local. Duzentas amostras de sangue consecutivas de pacientes em anticoagulação oral e da onco-hematologia foram utilizadas para realizar a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino como técnica de identificação das hemoglobinopatias. Para tal, realizamos eletroforese em acetato de celulose em pH 8,4 utilizando o sistema da Biosystems e, no caso de hemoglobinopatia S, a confirmação foi realizada com teste de afoiçamento. **Resultados:** Foram indentificados, nos grupos de anticoagulação oral, 3%, todos portadores de traço falcêmico, e no ambulatório de onco-hematologia 4%, sendo 3,5% de traço falcêmico e 0,5% de traço para hemoglobinopatia C. **Conclusão:** A frequência de hemoglobinopatias é similar à população da região.

Palavras-chave: Traço Falciforme; Hemoglobinopatias; Anemia Hemolítica.

019

Determinação das propriedades adesivas e funcionais em glóbulos vermelhos, neutrófilos e plaquetas de pacientes com talassemia beta intermediária

Bezerra MAC, Franco-Penteado CF, Mello MRB, Gambero S, Albuquerque DM, Lanaro C, Fertrin KY, Saad STO, Araújo AS, Costa FF
Universidade Estadual de Campinas – Unicamp-SP, Brasil

Introdução: A mutação IVS-I-6 (T->C) resulta em talassemia β +leve com níveis relativamente altos de produção de RNAm normal. Os homocigotos para essa mutação costumam apresentar quadro clínico ou expressão fenotípica compatível com β talassemia intermediária (TI). No entanto, trabalhos que avaliem essas características celulares, que possam contribuir para o esclarecimento da heterogeneidade clínica da talassemia intermediária (TI), são escassos na literatura. **Objetivos:** Avaliar a capacidade adesiva de células vermelhas, neutrófilos e plaquetas, quimiotaxia dos neutrófilos, os níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo na β -TI. **Casística e Método:** Dessa maneira foram selecionados pacientes com TI homocigotos para a mutação IVS-I-6 (T->C) ($n \leq 20$) e indivíduos controles (AA) ($n \leq 20$), acompanhados na Fundação Hemope. As técnicas utilizadas no desenvolvimento desse estudo foram: ensaio de quimiotaxia (ChemoTx) para avaliação da capacidade migratória dos neutrófilos, adesão estática para determinação da adesão basal das células, citometria de fluxo para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de moléculas de adesão, e ELISA para determinar a atividade da superóxido dismutase (SOD) e a dosagem das citocinas. **Resultados:** A adesão dos

neutrófilos, células vermelhas e plaquetas de pacientes TI foi significativamente maior ($13,2 \pm 1,2\%$, $p=0,003$; $7,24 \pm 0,6\%$, $p=0,0013$ e $21,2 \pm 3,3\%$, $p=0,005$ respectivamente) comparado com o grupo controle ($7,7 \pm 0,7\%$; $3,97 \pm 0,5\%$ e $9,5 \pm 1,0\%$, respectivamente). Das moléculas de adesão analisadas pela citometria de fluxo, não houve diferença estatística das integrinas CD11a e CD11b em neutrófilos; no entanto, para CD49d houve um aumento significativo quando comparado com o grupo AA ($p=0,013$; $4,9 \pm 0,7\%$ vs $2,3 \pm 0,5\%$). Em células vermelhas, o percentual de células positivas CD36, CD49d e CD71 foi significativamente maior ($p < 0,0001$; $10,9 \pm 1,8\%$, $1,4 \pm 0,3\%$ e $14,3 \pm 1,8\%$ respectivamente) quando comparado com o grupo AA ($0,6 \pm 0,1\%$; $0,13 \pm 0,02\%$ e $1,9 \pm 0,4\%$, respectivamente). A capacidade quimiotática dos neutrófilos foi significativamente maior nos TI. Nesses pacientes, a produção de ROS nos neutrófilos, nas células vermelhas e mononucleares, e os níveis plasmáticos das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 foram significativamente aumentados, enquanto a atividade enzimática da SOD foi significativamente reduzida em relação ao grupo AA. **Conclusões:** É possível que o aumento da aderência, da capacidade quimiotática, da produção de ROS, das citocinas e diminuição do mecanismo antioxidante, observados neste estudo, contribuam nas complicações clínicas encontradas na β -TI, tais como hipertensão pulmonar e úlceras de perna. O aumento global nos níveis das citocinas sugere que, na TI, há um processo inflamatório crônico que pode estar envolvido no aumento da adesão e quimiotaxia celular. Estudos adicionais podem contribuir para o entendimento das diferenças na apresentação clínica desses pacientes.

Palavras-chave: Quimiotaxia; Citocinas; Talassemia; Adesão

020

Clinical, hematological and molecular screening of patients carried of S, C and D hemoglobins in Salvador-Bahia-Brazil

Moura-Neto JP, Paz SS, Adorno EV, Lyra IM, Rocha L, Takahashi D, Souza CC, Goncalves NJ, Goncalves MS
CPqGM-Fiocruz/ FAR-UFBA/Hemoba, Salvador-BA, Brazil

Introduction: The sickle cell disease (SCD) has a high prevalence worldwide and is considered a public and social health problem in Brazil. **Aims:** Salvador city is located in state of Bahia and has the highest prevalence of the disease. Based on these facts, we conducted a study investigating clinical, hematological data, beta-S globin gene haplotypes (HAPLO) and alpha-thalassemia with 3.7kb deletion (TALA). **Methods:** Hemoglobin pattern was analyzed by HPLC, HAPLO by PCR-RFLP and TALA by PCR. The study was approved by CPqGM-Fiocruz human research board. **Results:** A total of 3.476 patients from the Hemoba – Salvador, Bahia were studied, with 1.683 (48.4%) males and 1.793 (51.6%) females. The mean age of patients was 23.87 ± 14.43 years. The hemoglobin pattern distributed among the patients was composed by 01 SD, 09 DD, 312 CC, 1299 SC and 1855 SS patients. Among the sickle cell anemia patients the means of red blood cells (RBC) was 2.91 ± 0.63 $10^{12}/L$, hemoglobin (Hgb) 7.74 ± 1.44 g/dL, hematocrit (Hct) $24.40 \pm 4.30\%$, mean cell volume (MCV) 86.08 ± 15.68 fL, mean cell hemoglobin (MCH) 27.31 ± 5.06 mg/dL, mean cell hemoglobin concentration (MCHC) 31.88 ± 3.20 g/dL, platelets 371.93 ± 185.68 $10^9/L$ and reticulocytes $7.57 \pm 5.37\%$. Out of 3.476 patients, 1.816 (52.2%) had hospitalization, mainly by painful crises (48.20%), bone pains (48.20%), infections (41.68%), vaso-occlusive crises (31.58%), splenic sequestration (8.96%) and stroke (5.42%). A total of 2176 beta S,C chromosomes were studied. Among the SS genotype, we found 0.12% CAR/SEN, 0.12% BEN/SEN, 0.12% SAU/DIATP, 0.12% ATP/ATP, 0.12% CAR/SAUDI, 0.35% SEN/ATP, 0.46% CAR/CAM, 0.58% BEN/SEN, 1.27% BEN/CAM, 2.31% CAR/

ATP, 2.77% BEN/ATP, 20.32% CAR/CAR, 26.56% BEN/BEN and 44.92% CAR/BEN. Among the SC genotype, 0.48% was CAM-I, 0.48% CAM-II, 0.48% ATP-I, 1.45% SAUDI-II, 7.73% CAR-II, 11.60% BEN-II, 33.82% CAR-I and 43.96% BEN-I and among the CC genotype, III-III was found in 9.1%, II-III in 9.1%, I-III in 18.2%, II-II in 27.3% and I-I in 36.4%. A total of 780 were genotyped to TALA with 140 (77.6%) with the wild type genotype, 155 (19.9%) heterozygous and 20 (2.5%) homozygous. Statistical significant results were found when TALA was associated with RBC ($p=0.020$), VCM ($p<0.0001$), HCM ($p<0.0001$) and platelets ($p=0.009$). The vaso-occlusive crises were more prevalent among CAR haplotype ($p=0.022$). Acute recurrent clinical events were decreased in frequency among Benin and Senegal haplotypes. **Conclusion:** The clinical expression of SS was modified by the HAPLO and TALA that were correlated with hematological and clinical profile. These associations increase our ability to predict clinical severity and the future risk of major organ failure among these patients. This work was supported by CNPq 484457/2007-1; Fapesb 1431040053063 and MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 409800/2006-6.

Palavras-chave: Sickle Cell Disease; Hemoglobinopathy.

021

Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplant fails to correct renal dysfunction in aged sickle cell mice

Archer D, Perry J, Chappa P
Emory University, Aflac Cancer Center and Blood Disorders Service, USA

Objectives: These studies were designed to test hypothesis that non-myeloablative hematopoietic transplant could effectively correct the sickle phenotype in aged sickle mice. **Methods:** Berkeley mice aged up to 2 years were screened for urine concentrating ability testing the osmolarity of spot urine samples. Groups of homozygous sickle cell mice aged 4, 12, and 52 weeks were treated with 20mg/kg busulfan (ip) the day previous to infusion with 20 million whole bone marrow cells from C57BL/6 mice. The mice also received 500ug each of anti-CD40L and CTLA4-Ig on days 0, 2, 4 and 7 as co-stimulation blockade. Peripheral hematology was monitored before and after transplant by CBC, and hemoglobin gel electrophoresis. Reticulocytes were enumerated by flow cytometry (Ter-119+/thiazole orange+/CD45-) and urine osmolarity measured using an osmometer. Peripheral blood samples were taken to monitor chimerism and hematological values at monthly intervals for six months following transplant. **Results:** Peripheral white blood cell chimerism was obtained at a level of 60-80% donor WBC chimerism corresponding to a ~100% peripheral RBC chimerism. RBC chimerism showed a marked enrichment over donor WBC due to the longer half-life of donor RBC. These levels of chimerism had an associated normalization of hemoglobin, hematocrit, and reticulocyte count. Multi-lineage WBC chimerism was present including donor B-cells, T-cells, macrophages and granulocytes. The urine concentrating ability, used as a non-invasive measure of kidney function, was restored to normal values following transplant at 4 and 12 weeks of age. However, mice transplanted at one year of age only showed a transient correction before returning to values typical of un-transplanted homozygous mice. Peripheral donor chimerism remained consistent during this period. **Conclusions:** Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation is able to restore hematopoiesis in aged mice and further correct a measure of kidney function young and adult mice. However, this data also suggests that irreversible damage to tubular function occurs in later adulthood. This concept of irreversible organ damage in sickle cell disease is likely to become

extremely important as therapies continue to prolong the lifespan of patients with sickle cell disease. This work was supported in part by NIH R01 DK081699Z and the EECRC.

Palavras-chave: Hematopoietic Stem Cell Transplantation.

022

Mechanisms of antioxidant defense in chronic hemolytic syndromes

Ofori-Acquah S
Emory University, USA

Objective: To identify specific antioxidants protecting individual organs from oxidative stress to help develop rationale antioxidant therapy to slow down the progression of organ damage in SCD. **Methods:** Microarray analysis of cultured endothelial cells, quantitative RT-PCR, western blot analysis and immunohistochemistry of organs from transgenic sickle cell mice and patients with sickle chronic lung disease. Vascular leak determined by the extravasations of Evans blue administered into the circulation of sickle cell mice. **Results:** Multiple candidate antioxidant enzymes were identified each differentially elevated in major organs in SCD mice compared to heterozygote and hemizygote littermates. No antioxidant was elevated in the brain, and moreover, the antioxidant phenotype in the kidney, spleen and liver of sickle mice were predominantly acute while the sickle lung was characterized by a predominantly chronic antioxidant phenotype. Enhanced expression of NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1) in sickle mice lungs was confirmed at the protein level by western blot analysis and by immunohistochemistry. NQO1 was expressed in the pulmonary endothelium at significantly higher levels in sickle chronic lung tissues of patients with SCD than in normal lung tissues ($p<0.002$). There was no difference in HO-1 staining in sickle human lung and normal lung tissues. Activity of NQO1 was significantly higher in the lungs of adult sickle mice aged 3-6 months than in younger mice aged 4-6 weeks ($p=0.004$), this enhanced activity declined significantly in middle-age mice 11-13 months old ($p=0.005$). Vascular permeability was normal in the brain of sickle mice of all ages but significantly abnormal in the lung, kidney and heart of adult sickle mice. This abnormality deteriorated significantly in the lung ($p=0.04$) but not in the heart or kidney resulting in lung edema in middle-aged mice. **Conclusions:** This study has shown for the first time that the antioxidant response to the systemic chronic hemolysis of SCD is organ-specific characterized by acute and chronic responses in different organs. Despite its established role in acute elimination of excess heme, HO-1 is not elevated in sickle lungs. Furthermore, we have identified decline of antioxidant reserve as a potential age-dependant risk factor for fatal lung complications in SCD. Finally, our data provide a framework to develop targeted antioxidant therapies to preserve organ function in SCD.

Palavras-chave: Antioxidants; Hemolysis; Sickle Cell.