

GRAZIELLE MECABO

Genótipo Duffy e Gravidade das Manifestações Clínicas na Anemia Falciforme

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2011

GRAZIELLE MECABO

Genótipo Duffy e Gravidade das Manifestações Clínicas na Anemia Falciforme

Orientadora:

Prof^a Dr^a Maria Stella Figueiredo

Coordenadora do curso de Pós Graduação:

Prof^a Dr^a Gisele Wally Braga Colleoni

Disciplina de Hematologia e Hemoterapia

UNIFESP/EPM

São Paulo

2011

Mecabo, Grazielle

xv,91p

Genótipo Duffy e Gravidade das Manifestações Clínicas na Anemia Falciforme/ Grazielle Mecabo.-- São Paulo, 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Hematologia.

Título em Inglês: Duffy Genotype and Clinical Manifestations Severity in Sickle Cell Anemia

Descritores: 1. Anemia Falciforme 2. Polimorfismos Gênicos 3. Sistema do Grupo Sanguíneo Duffy 4. Antígenos de grupos Sanguíneos 5. Genótipo

Aos meus pais Pedro e Nilve
e ao meu irmão Pedro Junior,
por todo amor, incentivo e apoio.

Ao meu Tio Senno (sempre
presente), por todo o carinho.

Este projeto foi desenvolvido com o suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil, Processo 05/55237-9) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, bolsa de Mestrado).

Agradecimentos:

À Deus, pela vida e por todas as bênçãos.

À Prof^a Dr^a Maria Stella, minha orientadora, aquela que permitiu que este caminho fosse trilhado, pelo apoio, paciência, confiança e pelo exemplo de pesquisadora.

À Marily, pelos ensinamentos e apoio em todos os momentos desse trabalho.

À Débora, minha parceira desse trabalho, pela amizade e apoio.

À Martha Mariana, pela amizade, confiança, incentivo e ajuda.

Aos funcionários da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP/EPM por toda colaboração.

Aos pacientes do Ambulatório de Hemoglobinopatias, pela inestimável colaboração para o estudo.

À Bianca e aos funcionários do Banco de Sangue pela colaboração.

Aos amigos: Faustino, Norma, Claudia, Bruna, Arthur, Alessandra, Cris, Carol, Roberta e Bruno por todo companheirismo, alegria e ajuda nos laboratórios de pesquisa.

A todos os meus amigos e amigas: Bela, Teca, Tule, Adri, Livia, Daniel, Thaís, Mindy, Fer, Dany, Silvia, Marion, Isa, Guto, Gabi, Naty, Laressa, Mariane, Thyeme, e Renata por todo apoio, cumplicidade, carinho.

À minha Vó Olinda, e a todos os meus familiares por todo incentivo e apoio.

Ao meu irmão, meu melhor amigo e meu maior orgulho, por toda a cumplicidade e confiança e, à Kamila, pela paciência e apoio.

Aos meus pais, por serem a minha base mais sólida, por todo amor, carinho e incentivo.

Sumário	<i>páginas</i>
Dedicatória	i
Agradecimentos	iii
Lista de Figuras e Gráficos	vi
Lista de Tabelas e Quadros	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	ix
Resumo	xii
Abstract	xiv
1 Introdução	1
<u>1.1 Objetivos</u>	4
2 Revisão de Literatura	5
3 Casuística	26
4 Métodos	27
5 Resultados	47
6 Discussão	61
7 Conclusões	68
8 Referências Bibliográficas	69
APÊNDICES	75
ANEXOS	90

Lista de Figuras e Gráficos

- Figura 1:** Representação em 3 dimensões de modelo GPD compacto utilizando software Dino. **18**
- Figura 2:** Eletroforese da amplificação do exon 2 do gene *DUFFY* em gel de agarose 2%. **33**
- Figura 3:** Foto da eletroforese em gel de agarose da digestão com a enzima *BanI* do produto da PCR do exon 2. **35**
- Figura 4:** Foto da eletroforese em gel de agarose da digestão com a enzima *MspA1I* do produto da PCR do exon 2. **36**
- Figura 5:** Foto da eletroforese em gel de agarose da digestão com a enzima *MwoI* do produto da PCR do exon 2. **38**
- Figura 6:** Eletroforese da amplificação da região promotora GATA em gel de agarose 2%. **39**
- Figura 7:** Foto da eletroforese em gel de *Low Melting* da digestão com a enzima *StyI* do produto da PCR da região promotora GATA. **41**
- Figura 8:** Eletroesferograma da região do polimorfismo *rs12075* (125G>A) no exon 2. **44**
- Figura 9:** Eletroesferograma das regiões das mutações *rs34599082* (265C>T) e *rs13962* (298G>A) no exon 2. **44**
- Figura 10:** Eletroesferograma da região da mutação *rs281477* (-33T>C) na região promotora GATA.. **45**
- Gráfico 1:** Análise da manifestação de PAP segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo. **55**
- Gráfico 2:** Análise da manifestação de AVE segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo. **59**

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1:	Terminologia do Sistema de grupo sanguíneo Duffy adotada pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea.	14
Tabela 1:	Sequência de <i>primers</i> utilizados na genotipagem do gene <i>DUFFY</i> .	32
Tabela 2:	Sequência de <i>primers</i> iniciadores utilizados na genotipagem do GATA.	38
Tabela 3:	Freqüência alélica do gene <i>DUFFY</i> polimorfismo <i>rs12075</i> (125G>A) e freqüência das mutações <i>rs2814778</i> (-33T>C), <i>rs34599082</i> (265C>T) e <i>rs13962</i> (298G>A) nos pacientes com AF.	48
Tabela 4:	Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a+b-).	49
Tabela 5:	Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a+b+).	50
Tabela 6:	Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a-b+).	51
Tabela 7:	Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a+b+).	51
Tabela 8:	Distribuição das manifestações laboratoriais segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	53
Tabela 9:	Distribuição da manifestação de PAP segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	54
Tabela 10:	Distribuição da manifestação de priapismo segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	56

Tabela 11:	Distribuição da manifestação de ON segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	56
Tabela 12:	Distribuição da manifestação de STA segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	57
Tabela 13:	Distribuição da manifestação de UMI segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	57
Tabela 14:	Distribuição da manifestação de AVE segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	58
Tabela 15:	Distribuição do uso de HU segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.	60
Tabela 16:	Distribuição fenotípica do Sistema Duffy em grupos populacionais de doadores de sangue brasileiros e em portadores de AF no Brasil e na Antilha Holandesa.	62

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus Centígrados
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
Asp	Ácido aspártico
AVE	Acidente Vascular Encefálico
<i>BanI</i>	Enzima de restrição <i>BanI</i>
C	Citosina
Cys	Cisteína
DARC	<i>Duffy Antigen receptor for quimoquine</i> (Antígeno Duffy receptor para quimiocina)
dATP	Deoxi-adenina trifosfato
dCTP	Deoxi-citosina trifosfato
dGTP	Deoxi-guanina trifosfato
DHL	Desidrogenase láctica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNA Ladder	Marcador de Peso Molecular
DNTP	Dideoxynucleotídeo
dNTP	Deoxynucleotídeo trifosfato
<i>DP</i>	Desvio padrão
dTTP	Deoxi-timina trifosfato
EDTA	Ácido ethilenodiaminotetraacético
et al	e outros
Fy	Símbolo Duffy no SITS
<i>FY*A</i>	Gene <i>FY*A</i>
<i>FY*A/FY*B</i>	Gene <i>FY*A/FY*B</i>
<i>FY*B</i>	Gene <i>FY*B</i>
<i>FY*B-33</i>	Gene <i>FY*B-33</i>
<i>FY*B^{fraco}</i>	Gene <i>FY*B^{fraco}</i>
<i>FY*X</i>	Gene <i>FY*X</i>
Fy3	Antígeno Fy3
Fy4	Antígeno Fy4
Fy5	Antígeno Fy5
Fy6	Antígeno Fy6
Fy ^a	Antígeno Fy ^a
Fy ^b	Antígeno Fy ^a
G	Guanina
Gly	Glicina

GPD	Glicoproteína Duffy
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HU	Hidroxiureia
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
IL-8	Interleucina 8
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	KiloDowton
L	Litro
M	Molar
MCP-1	Proteína Quimotática de Monócito
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MGSA	Fator estimulador da atividade de melanócito
MIP-1	Proteína Inflamatória de Macrófago 1
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
mmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
<i>MspA1 I</i>	Enzima de restrição <i>MspA 1I</i>
<i>Mwol</i>	Enzima de restrição <i>Mwol</i>
NaCl	Cloreto de sódio
Ng	Nanograma
NO	Óxido Nítrico
ON	Osteonecrose
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P.vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAP	Pressão da Artéria Pulmonar
pb	Pares de base
PCR-RFLP	PCR-RFLP <i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Lenght Polymorphism</i> , Reação em Cadeia de Polimerase – Análise de polimorfismo a partir de digestão enzimática
pg/mL	Picograma/mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PvDbp	(<i>P. vivax</i> Duffy-binding protein/ Proteína Duffy associada ao <i>P. Vivax</i>)

RANTES	Células Expressas e Secretadas Reguladas na Ativação
Rh	Rhesus
rpm	Rotações por minuto
SITS	Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue
STA	Síndrome Torácica Aguda
Styl	Enzima de restrição Styl
T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Thr	Treonina
Tris-HCl	Tris-Ácido Clorídrico
U	Unidade
UMI	Úlcera de Membro Inferior
V	Volt
V/T	Velocidade tricúspide
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
α	Alfa
β	Beta

RESUMO

INTRODUÇÃO: Anemia falciforme (AF) apresenta grande variabilidade clínica e estudos prévios sugerem que polimorfismos genéticos podem atuar como preditores de complicações. O antígeno Duffy parece ter importante papel na retirada de quimiocinas inflamatórias da circulação, sugerindo que indivíduos Duffy-Negativo apresentariam menor *clearance* de citocinas e maior lesão endotelial. **OBJETIVOS:** Em um grupo de indivíduos com diagnóstico de AF, tivemos por objetivos: determinar a frequência dos fenótipos do sistema Duffy, determinar a frequência alélica do gene *DUFFY*, correlacionar os achados fenotípicos com os genotípicos, determinar a importância dos fenótipos Duffy em alterações clínico-laboratoriais selecionadas. **CASUÍSTICA:** 90 pacientes com AF em acompanhamento regular no ambulatório de hemoglobinopatias da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM). **MÉTODOS:** A fenotipagem eritrocitária foi realizada pela técnica de hemaglutinação em gel. A pesquisa molecular do gene *DUFFY* foi feita com *primers* específicos através da técnica de PCR seguida de digestão com enzimas específicas. Foram analisados o polimorfismo *rs12075* (125 G>A) que identifica os alelos *FY*A* e *FY*B*; as mutações: *rs2814778* (-33 T>C) que caracteriza o alelo *FY*B-33*; e *rs34599082* (265 C>T) e *rs13962* (298G>A) que identificam o alelo *FY*B^{fraco}*. Esses indivíduos foram estratificados, de acordo com os fenótipos, em Duffy-Positivo [Fy(a+b-), Fy(a+b+) e Fy (a-b+)] e Duffy-Negativo [Fy(a-b-)]. Através de revisão de prontuários, foram avaliados: hemoglobina basal (Hb), hemoglobina fetal (HbF), hemoglobina S (HbS), reticulócitos e dosagem de desidrogenase láctica (DHL), úlceras de membros inferiores (UMI), priapismo, episódios de síndrome torácica aguda (STA), osteonecrose (ON), elevação da pressão da artéria pulmonar (PAP \geq 30mmHg), acidente vascular encefálico (AVE: história e exames de imagem alterados) e indicação de uso de hidroxiuréia (HU). A análise estatística foi realizada com os seguintes testes: Mann-Whitney e Fisher, com nível descritivo de 5%. **RESULTADOS:** Dos 90 pacientes estudados, 40% eram do gênero masculino, a mediana de idade foi de 30,04 \pm 10,15 anos. A análise fenotípica mostrou que 73,3% dos indivíduos eram Duffy-Positivo e 26,7% eram Duffy-Negativo. Observamos maior prevalência do alelo

*FY*B* (71%), sendo que o alelo *FY*B-33* foi encontrado em 43% dos alelos *FY*B* analisados. Os pacientes Duffy-Negativo apresentaram média de Hb de 8,32g/dL, enquanto o grupo Duffy-Positivo mostrava 9,01g/dL ($p=0,039$). As análises de reticulócitos, HbS, HbF não mostraram significância. O DHL, por sua vez, apresentou média de 634,59U/L nos indivíduos Duffy-Negativo e, 506,42U/L ($p=0,045$). 63,6% dos indivíduos Duffy-Negativo e 31,5% do outro grupo apresentaram elevação de PAP ($p=0,0118$; Razão de Chances: 3,792; 95% Intervalo de Confiança: 1,350- 10,652). Não houve diferença significativa na frequência de priapismo, ON, STA e UMI entre os grupos. A manifestação de AVE foi observada apenas nos pacientes Duffy-Positivo ($p=0,0049$; Razão de Chances: 0,0625; 95% Intervalo de Confiança: 0,0035-1,089). A indicação de uso de HU foi maior nos indivíduos Duffy-Positivo ($p=0,0528$; Razão de Chances: 0,3524; 95% Intervalo de Confiança: 0,1278-0,9717). **CONCLUSÃO:** Diante os resultados apresentados, podemos inferir que a presença das mutações estudadas está fortemente associada à expressão do Sistema Duffy. Do ponto de vista dos dados clínico-laboratoriais associados ao Sistema Duffy, embora os indivíduos Duffy-Negativo apresentem maior frequência de PAP elevada, seu índice de utilização de HU é menor e, portanto, não conseguimos afirmar que apresentam pior evolução clínica. Com isso, mais estudos, de preferência multicêntricos, são necessários para esclarecer esta questão.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Sickle cell anemia (SCA) presents with large clinical variability and previous studies suggest that genetic polymorphisms may act as complications predictors. The Duffy antigen appears to play an important role in the removal of inflammatory chemokines from the circulation, suggesting that Duffy-Negative individuals have lower clearance of cytokines and increased endothelial injury. **OBJECTIVES:** To determine the frequency of Duffy phenotype, determine the allelic frequency of gene *DUFFY*, correlate the phenotypic findings with the genotype and determine the importance of the Duffy phenotype in clinical and laboratory data from a group of SCA patients. **PATIENTS:** 90 AF patients regularly followed in the outpatient clinic of Hemoglobinopathies of the Department of Hematology, Federal University of São Paulo (UNIFESP / EPM). **METHODS:** Erythrocyte phenotyping of Duffy blood group was performed by hemagglutination in gel and molecular analysis of *DUFFY* gene was performed with specific PCR primers followed by digestion with restriction enzymes. We analyzed the *rs12075* polymorphism (125 G> A) that identifies the alleles *FY*A* and *FY*B*; mutations: *rs2814778* (-33 T>C) that characterizes the allele *FY*B-33*, and *rs34599082* (265 C>T) and *rs13962* (298G>A) that identify the alleles *FY*B^{weak}*. These individuals were stratified according to the phenotype, in Duffy-Positive [Fy (a+b-), Fy (a+b+) and Fy (a-b+)] and Duffy-Negative [Fy(ab-)]. Through medical records review, we evaluated baseline hemoglobin (Hb), fetal hemoglobin (HbF), S hemoglobin (HbS), reticulocytes count, serum lactate dehydrogenase (LDH), ulcers of the lower limbs (UML), priapism, acute chest syndrome episodes (STA), osteonecrosis (ON), elevated pulmonary arterial pressure (PAP \geq 30 mmHg), stroke (history and neuroimaging) and indication of use of hydroxyurea (HU). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney and Fisher tests, with a significance level of 5%. **RESULTS:** 40% of the patients were male, median age was 30.04 ± 10.15 years. Phenotypic analysis revealed 73.3% Duffy-Positive and 26.7% Duffy-Negative individuals. The allele *FY*B* was found in 71% of the patients, and the *FY*B-33* allele was found in 43% of the *FY*B* alleles. Duffy-Negative patients had a mean Hb of 8.32 g/dL, while Duffy-Positive the mean Hb was 9.01 g/dL ($p = 0.039$). There were no differences in

the reticulocyte count, Hb, HbF within the groups. However, the mean DHL was 634.59 U/L in Duffy-Negative individuals and 506.42 U/L in Duffy-Positive ($p=0.045$). 63.6% of Duffy-Negative individuals and 31.5% in Duffy-Positive showed elevated PAP ($p = 0.0118$, odds ratio: 3.792, 95% confidence interval: 1.350 to 10.652). There were no statistical differences in priapism, ON, STA and UMI frequencies of among groups. Stroke was observed only in Duffy-Positive patients ($p=0.0049$, odds ratio: 0.0625, 95% Confidence Interval: 0.0035 to 1.089). Indications of HU use was higher in Duffy-Positive subjects ($p=0.0528$, odds ratio: 0.3524, 95% Confidence Interval: 0.1278 to 0.9717).

CONCLUSION: Given the results above, we can infer that the presence of the studied mutations is strongly associated with expression of the Duffy antigens. From clinical and laboratory data viewpoint, although Duffy-Negative individuals had a greater frequency of PAP, its rate of use of HU is smaller and therefore one can not say that they had a worse clinical outcome. Thus, further studies, preferably multicenter, are needed to clarify this issue.

1 Introdução

As doenças hereditárias causadas por alterações na hemoglobina, hemoglobinopatias, afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Dentre estas doenças, destaca-se a anemia falciforme (AF), resultante de mutação de ponto no gene da cadeia globínica β resultando na formação de uma hemoglobina anormal, a Hemoglobina S (HbS). (Steinberg 2005)

Quando desoxigenada, a HbS polimeriza-se gerando estruturas granulares que se organizam em feixes de fibras ao longo da célula, perturbando a estrutura e função do eritrócito, resultando na chamada célula falciforme. A formação destes polímeros é determinante crítico da alteração na morfologia do eritrócito e depende de três variáveis: grau de desoxigenação, concentração de hemoglobina intracelular e presença ou ausência de Hemoglobina fetal (HbF). (Bunn 1997; Steinberg and Rodgers 2001)

Além do perfil hemolítico crônico da AF, a manifestação vaso-oclusiva é característica desta doença, levando à diversidade de manifestações clínicas habitualmente observadas nestes pacientes. (Pathare, Kindi et al. 2003)

Com os avanços em pesquisa na área médica na primeira metade do século XX, a identificação de antígenos eritrocitários teve o reconhecimento de sua importância na prática transfusional. (Landsteiner 1931) A Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT- *International Society of Blood Transfusion*) reconhece 29 sistemas de grupos sanguíneos, entre eles o sistema de grupo sanguíneo Duffy. (Daniels, Fletcher et al. 2004)

O sistema Duffy, descoberto em 1950, é definido a partir dos soros anti-Fy^a e anti-Fy^b. (Cutbush and Mollison 1950) Na população caucasiana são encontrados três fenótipos maiores: Fya(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+). A ausência dos antígenos Fy^a e Fy^b nos eritrócitos define um quarto fenótipo Fy(a-b-), presente em 70% de afro-descendentes e raro em caucasianos. (Cutbush and Mollison 1950; Chaudhuri, Polyakova et al. 1995)

O gene *DUFFY*, localizado na região 1q22-q23, apresenta dois alelos, *FY*A* e *FY*B*, que diferem em uma única de base, no nucleotídeo 125 do cDNA. No alelo *FY*A*, a base observada é a guanina (G) e no alelo *FY*B* a base é a adenina (A). (Tournamille, Colin et al. 1995)

O alelo *FY*B* pode apresentar mutações de ponto em outras regiões que, aparentemente, são responsáveis por alteração em sua expressão fenotípica. A menor expressão fenotípica do *FY*B*, conhecida como *FY*B^{fraco}*, é resultante da mutação 265C>T, com troca do aminoácido Arginina por Cisteína na posição 89 do gene *DUFFY*. Contudo, outra mutação também parece estar associada a este fenótipo, a troca 298G>A responsável pela substituição de Alanina por Treonina no aminoácido 100 do gene *DUFFY*. (Tournamille, Colin et al. 1995; Olsson, Smythe et al. 1998) Ou seja, esses indivíduos herdam o alelo *FY*B^{fraco}* ou *FY*X*, que difere do alelo *FY*B* por essas duas mutações. (Tournamille, Le Van Kim et al. 1998)

A ausência de expressão do *FY*B*, por sua vez, é devida a uma mutação pontual na seqüência GATA da região promotora, caracterizando o alelo *FY*B-33*. De modo geral, os indivíduos afro-descendentes com fenótipo Fy(a-b-)

apresentam esta mutação na sua forma homozigota. (Tournamille, Colin et al. 1995; Iwamoto, Li et al. 1996)

Os antígenos Duffy são carregados por proteínas integrais da membrana de eritrócitos, sendo também conhecidas como receptor de antígeno Duffy para quimiocinas, DARC (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) cujo papel é atrair elementos leucocitários aos sítios de inflamação. A glicoproteína DARC liga mediadores inflamatórios que atuam sobre os neutrófilos e sobre o endotélio facilitando a adesão leucocitária. Além disso, o DARC parece ser responsável pela retirada (*clearance*) da Interleucina-8 (IL-8) da circulação, impedindo que esta ative os neutrófilos. (Horuk, Chitnis et al. 1993; Abbas, Lichtman et al. 2003)

Devido à sua ascendência, os indivíduos com AF tendem a apresentar o fenótipo Fy(a-b-) em maior frequência. Com isso, eles apresentariam menor *clearance* de IL-8 e, como conseqüência, aumento de seus níveis séricos, implicando em uma associação entre fenótipo Duffy-Negativo e maior agravo de crises, como a oclusão vascular. (Afenyi-Annan, Kail et al. 2008) Os estudos até agora apresentados, entretanto, são controversos. Enquanto Schnog et al não observaram alterações dos níveis de IL-8 em indivíduos com fenótipo Duffy negativo (Schnog, Keli et al. 2000), Afenyi-Annan et al relataram forte associação entre Duffy negativo e dano tecidual crônico, em especial a proteinúria. Estes últimos concluem que a genotipagem do *DUFFY* poderia ser um potencial biomarcador para indicar indivíduos propensos ao desenvolvimento de necrose tecidual. (Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

1.1 Objetivos

Como demonstrado, o papel do sistema Duffy na anemia falciforme ainda não está estabelecido, por isso, tivemos como objetivos:

1. Determinar a frequência do fenótipo Duffy no grupo de indivíduos com AF;
2. Determinar a frequência alélica do gene *DUFFY* na amostra estudada;
3. Correlacionar os achados fenotípicos com os genotípicos;
4. Determinar a importância do fenótipo Duffy nas alterações laboratoriais de hemoglobina sérica, porcentagem de HbS, porcentagem de HbF, contagem de reticulócitos e dosagem de desidrogenase láctica.
5. Determinar a importância do fenótipo Duffy em manifestações clínicas selecionadas.

2 Revisão de literatura:

2.1 Anemia Falciforme:

As hemoglobinopatias compreendem um grupo de anemias hereditárias caracterizadas pela alteração estrutural no cromossomo 11 que resulta na troca do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta da hemoglobina (Hb) levando a produção de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (HbS). Geneticamente a pessoa que recebe de um dos pais a hemoglobina A (hemoglobina normal) e de outro a HbS é chamada de “traço falcêmico”, sendo representado por HbAS. O portador de traço falcêmico não é doente sendo, portanto, geralmente assintomático e só descoberto quando é realizada a eletroforese de hemoglobina. Quando uma pessoa recebe de ambos, pai e mãe, a HbS, ela tem a Anemia Falciforme (AF), cuja representação é SS. (ANVISA 2002; Vicari 2007)

Ocorre, entretanto, em alguns indivíduos, a união de um alelo S com outro alelo também doente (hemoglobina C, hemoglobina D, β -talassemia), levando ao aparecimento das outras síndromes falciformes, como a hemoglobinopatia SC, SD, S β -talassemia. (Stuart and Nagel 2004)

A AF acomete mais freqüentemente afro-descendentes e foi descoberta nos Estados Unidos em 1910 por um cardiologista, James Herrick, em um estudante afro-descendente de 20 anos que apresentava manifestações clínicas desta doença. (Herrick 1910)

Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora de transtornos das hemoglobinas, representados, na sua maioria,

pelas talassemias e pela doença falciforme. Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde, nascem no Brasil 3.500 crianças por ano com doença falciforme e 200.000 com traço falciforme, e estima-se que 7.200.000 pessoas sejam portadoras do traço falcêmico (HbAS) e entre 25.000 a 30.000 com doença falciforme.(Jeans, Ramalho et al. 1993; ANVISA 2002)

De modo geral, a sobrevida destes pacientes está diminuída, com média da idade de 42 anos nos homens e de 48 anos em mulheres. (Platt, Brambilla et al. 1994)

A doença foi primeiramente reconhecida nos afro-descendentes e espalhou-se para várias regiões do mundo através de migração e do tráfico de afro-descendentes. Sabe-se que as pessoas portadoras do traço falcêmico apresentam maior resistência à malária, o que significa maior sobrevivência em regiões endêmicas da doença na África. A doença apresenta-se também em caucasianos provenientes do Mediterrâneo (Grécia, Itália, etc.), Península Arábica e Índia. (Serjeant 1997)

Há cinco diferentes haplótipos associados ao gene da HbS, cada um recebendo o nome da região ou grupo étnico em que é mais prevalente: Senegal, Benin, Banto, Camarões e Árabe-Indiano.(Flint, Harding et al. 1998) No Brasil predomina o haplótipo Banto, seguido do Benin com quase ausência do haplótipo Senegal.(Figueiredo, Kerbauy et al. 1996)

Em condições de hipóxia ocorre polimerização da HbS, base fisiopatológica da doença, com conseqüente deformação das hemácias, que

adquirem a forma de foice. A polimerização caracteriza-se pela aglutinação da hemoglobina em forma de polímeros gelatinosos, que acabam por distorcer as hemácias que se tornam rígidas. Quando recebe novamente o oxigênio, a hemoglobina reassume sua forma normal, porém, após algum tempo, devido a alterações secundárias às diversas polimerizações, a hemoglobina mantém a forma de foice permanentemente. Nessa fase, conhecida como hemácia irreversivelmente falcizada, a hemácia é retirada permanentemente da circulação, contribuindo para a manifestação de anemia hemolítica crônica. (Stuart and Nagel 2004)

A AF é caracterizada por hemólise crônica e isquemia recorrente devido à oclusão micro-vascular, seguida de adesão de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular. O afoiçamento das hemácias tem como conseqüências diminuição da oxigenação tecidual e redução da vida útil das hemácias, que passa de 120 para aproximadamente 20 dias, quando (então) são retiradas da circulação pelo baço. A destruição precoce das hemácias leva à manifestação de anemia hemolítica crônica, criando a necessidade da produção constante de eritrócitos. Por sua vez, a hipóxia tecidual acarreta gradual lesão dos tecidos e alterações das funções orgânicas. (ANVISA 2002)

O processo de hemólise inicia-se por um ataque global à via da arginina-óxido nítrico (arginina-NO). Em condições normais, a Hb encontra-se seguramente envolvida pela membrana do eritrócito. No entanto, durante hemólise, ela é descompartmentalizada e liberada no plasma, onde rapidamente reage e destrói o NO. Isso resulta em diminuição de oferta de NO e formação de espécies reativas de oxigênio, o que inibe a vasodilatação. A destruição do NO pela Hb pode ainda prejudicar a função do endotélio vascular

através da ativação transcripcional de moléculas de adesão, incluindo VCAM-1 e E-seletina e de potentes vasoconstritores como endotelina-1. Além disso, a liberação simultânea de arginase do eritrócito durante hemólise irá limitar a disponibilidade de arginina para a formação de NO, contribuindo para a deficiência de NO. (Morris 2008)

A arginase ainda redireciona o metabolismo da L-arginina para a L-ornitina e ocorre a formação de poliaminas e L-prolina, que são essenciais para o crescimento de células musculares lisas e síntese de colágeno. Sendo assim, a indução de arginase pode ainda promover aberrante remodelação da parede venosa e formação de tecido neointimal. Essa modificação do metabolismo para a via da ornitina contribui na proliferação da vasculopatia comumente encontrada em desordens hemolíticas. (Morris 2008)

2.1.1 Manifestações clínicas:

As manifestações clínicas começam a aparecer a partir do primeiro ano e estendem-se durante toda a vida. (Zago and Pinto 2007) Na infância, a principal característica clínica relaciona-se às manifestações infecciosas e o reconhecimento tardio desta doença contribui para a alta taxa de óbito por infecção observada nos primeiros anos de vida. (Braga 2007) Porém existe grande heterogeneidade individual quanto à gravidade de cada uma dessas alterações, especialmente para complicações vaso-oclusivas. (Costa, Vilela et al. 2006)

Como os glóbulos falcizados nem sempre conseguem passar através de pequenos vasos, a manifestação vaso-oclusiva é característica desta doença, levando a uma diversidade de manifestações clínicas: crise algica,

osteonecroses, úlceras de membros inferiores, disfunção pulmonar e renal, acidente vascular encefálico (AVE) e retardo na maturação física, priapismo entre outras. (Stuart and Nagel 2004; Braga 2007)

A elevação da pressão da artéria pulmonar (PAP) está associada ao risco elevado de mortes em adultos com AF. (Kato, Gladwin et al. 2007) Apesar do diagnóstico de hipertensão pulmonar ser realizado através de estudo hemodinâmico, a ecodopplercardiografia é um dos métodos utilizados para seu *screening*. Classicamente, na AF, a velocidade de regurgitação de tricúspide acima de 2,5m/s é considerada como valor de corte da elevação da PAP nestes pacientes. (McLaughlin VV, Archer SL et al. 2009)

O priapismo é definido pela ereção peniana prolongada e dolorosa não acompanhada por estímulo sexual. São descritos em dois tipos: baixo fluxo (isquêmico) e alto fluxo (não isquêmico). (Keoghane, Sullivan et al. 2002) Em pacientes com anemia falciforme é típico o de baixo fluxo, podendo ocorrer de modo agudo ou recorrente que é caracterizado por episódios durante o sono nos quais não ocorre a detumescência ao acordar. Em geral dura menos de três horas, não cursa dor intensa e tende a cessar espontaneamente. A idade média dessa manifestação é de 20 anos, podendo ocorrer antes da primeira década de vida. Estudos sugerem que o priapismo acomete 30% a 45% dos pacientes com anemia falciforme. (Pryor, Akkus et al. 2004; Rogers 2005; Vicari and Figueiredo 2007)

A osteonecrose (ON) consiste em infarto e necrose nas superfícies articulares e cabeça de ossos longos na ausência de fatores responsáveis, tais como osteomielite, traumatismo ou tumor. É freqüente em portadores de

anemia falciforme podendo ser causada por infecções ou isquemia vascular (vaso-oclusão). (Ebong 1980; Nebor, Durpes et al. 2010)

Síndrome torácica aguda (STA) é a causa mais freqüente de internação hospitalar e a principal causa de mortalidade em jovens adultos com AF, acometendo cerca de 40% desses pacientes. Manifesta-se com o aparecimento de um infiltrado pulmonar recente associado a sintomas respiratórios e febre. (Stuart and Nagel 2004; Rees, Williams et al. 2010)

Úlceras de membros inferiores (UMI) são complicações freqüentes em adultos e ocorrem entre 8% a 10% dos pacientes homocigotos e pode ocorrer antes dos 10 anos de idade. O mecanismo de obstrução causado pelas hemácias falcizadas, infecções bacterianas, trombose, anemia com diminuição na capacidade de transporte de oxigênio e diminuição de NO são os fatores que contribuem para o desenvolvimento de úlceras. Minniti et al (2010) uma associação entre UMI e hipertensão pulmonar. O estudo analisou o ecodoppler de 88 pacientes (SS) onde 12 tinham diagnóstico de úlcera (grupo 1) e 76 não tinham essa manifestação (grupo 2), a prevalência de hipertensão pulmonar foi de 91,6% no grupo 1 e 31,6% no grupo 2 ($p=0.0001$). (Minniti, Eckman et al. 2010)

O acidente vascular encefálico (AVE) é outra manifestação importante na infância e ocorre em cerca de 10% das crianças com doença falciforme antes dos 20 anos. (Ohene-Frempong, Weiner et al. 1998) Deve ser considerado como complicação grave devido à elevada morbi-mortalidade associada. Coligadas ou não ao AVE, podem ser observadas outras complicações do sistema nervoso central como convulsões, encefalopatia,

hipertensão intracraniana, meningite, alterações mentais por distúrbios metabólicos, neuropatia periférica e hipertensão intracraniana por oclusão venosa.(Angulo 2007)

2.1.2 Tratamento:

O tratamento da doença consiste em medidas preventivas para amenizar as conseqüências de anemia crônica, das crises de falcização e da susceptibilidade às infecções. Essas medidas incluem boa nutrição, profilaxia anti-infecciosa, diagnóstico e terapêutica precoce das complicações e hidratação adequada. Para isso, é necessário o acompanhamento clínico e realização de exames de rotina pelo menos 4 vezes por ano, além da informação adequada sobre a doença e educação da família do paciente, essenciais para obtenção de bem estar social e mental.(Braga 2007)

Dentre as opções terapêuticas, a hidroxiuréia (HU) é a única droga licenciada nos Estados Unidos, para tratamento da AF e apresenta vários efeitos diretos e indiretos nos mecanismos fisiopatológicos da AF, tais como: aumento da hemoglobina, redução da hemólise, diminuição da aderência dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular, diminuição da viscosidade sanguínea e vasodilatação, contribuindo para a diminuição dos fenômenos inflamatórios e vasos-oclusivos. (Okpala 2005; Figueiredo 2007; Cançado, Lobo et al. 2009; Lanaro, Franco-Penteado et al. 2009)

Até o momento presente, a HU foi o único medicamento que, efetivamente, teve impacto na melhora da qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme, reduzindo o número de crises vaso-oclusivas, número de

hospitalizações, tempo de internação, ocorrência de síndrome torácica aguda e, possivelmente, de eventos neurológicos agudos, além de demonstrar, de maneira contundente, redução da taxa de mortalidade quando comparada à mesma taxa no grupo de pacientes sem HU. (Vichinsky, Hurst et al. 1988; Platt, Brambilla et al. 1994; Cançado, Lobo et al. 2009)

A transfusão de concentrado de hemácias tem um papel estabelecido na gerência de algumas complicações. Nas crises de seqüestro e aplástica é recomendada a transfusão simples. A transfusão de substituição da massa circulante, por sua vez, tem indicação em: AVE agudo, pré-operatório, síndrome torácica aguda e priapismo. (Costa 2004; Rees, Williams et al. 2010)

A transfusão crônica, indicada no acompanhamento dos indivíduos com AVE para evitar recidivas, tem como objetivo diminuir a porcentagem de HbS (abaixo de 30%), porém para esses pacientes é necessário o monitoramento dos depósitos de ferro com o objetivo de evitar os danos da sobrecarga de ferro no organismo.(Costa 2004)

Os pacientes com AF possuem alto risco de aloimunização, geralmente atribuída à diferença da origem étnica entre pacientes (afro-descendentes) e doadores de sangue (geralmente caucasianos), razão pela qual é aconselhada a fenotipagem, pelo menos, dos sistemas ABO, Rhesus (Cc/D/Ee) e Kell. (Quirolo 2010; Rees, Williams et al. 2010)

No Brasil, a comparação dos fenótipos eritrocitários entre doadores de sangue e indivíduos com doença falciforme mostrou similaridade entre os grupos, atribuída à grande miscigenação racial do nosso país. Este estudo

mostra que, possivelmente, o risco de aloimunização no Brasil seja menor que o encontrado nos Estados Unidos. (Moreira Junior, Bordin et al. 1996)

2.2 Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy:

A descoberta do sistema Duffy ocorreu em 1950 por Cutbush et al, durante investigação de reação transfusional hemolítica em um paciente, (Sr. Duffy), hemofílico politransfundido, que mostrou a presença de novo anticorpo no soro desse paciente que reagia com 64,9% das 205 amostras testadas de indivíduos não aparentados na população inglesa, este anticorpo foi designado anti-Fy^a.(Cutbush, Mollison et al. 1950)

Um ano depois, Ikin et al relataram a existência de outro anticorpo, encontrado casualmente no soro de mulher múltipara que não havia recebido transfusões e cujos filhos não tinham manifestado doença hemolítica do recém nascido, que era antitético em relação ao anti-Fy^a e foi então denominado anti-Fy^b.(Ikin, Mouran et al. 1951) Tanto quanto anti-Fy^a quanto anti-Fy^b, são anticorpos de subclasse tipo IgG1. Em uma série de estudos Szymanski et al verificaram que a maioria dos anticorpos anti-Duffy era composta de IgG1, 18% de IgG2 e 25% eram de IgM.(Szymanski, Huff et al. 1982)

A partir dos estudos sorológicos do sistema Duffy, foi observado que os antígenos Fy^a e Fy^b são os principais do sistema Duffy e são produtos de seus respectivos alelos *FY*A* e *FY*B*. Estes antígenos estão presentes nos eritrócitos a partir da 6^a semana de gestação, e sua quantidade não varia durante a vida. Podem causar reações transfusionais imediatas ou tardias e

também podem levar à doença hemolítica do recém-nascido. (Toivanen and Hirvonen 1973; Daniels, Poole et al. 2002) Este sistema é classificado como número 0008 na nomenclatura de grupos sanguíneos da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (SITS). (Quadro 1)

Quadro 1: Terminologia do Sistema de grupo sanguíneo Duffy adotada pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea: (Issit and Anstee 1998)

<p>Nome convencional: Duffy</p> <p>Símbolo Convencional: Fy</p> <p>Símbolo SITS: FY</p> <p>Número SITS: 008</p>		
Nome Convencional do Antígenos	Número SITS dos Antígenos	Código Numérico SITS
Fy^a	FY1	08001
Fy^b	FY2	08002
Fy3	FY3	08003
Fy4	FY4	08004
Fy5	FY5	08005
Fy6	FY6	08006

O antígeno Fy3 foi descrito por Albrey et al ao detectarem o anticorpo (anti-Fy3) no soro de uma mulher Fy(a-b-) caucasóide múltipara que recebera transfusão de sangue. Este antígeno está presente em todas as células que possuem expressão dos antígenos Fy^a e Fy^b e, portanto, ausente nas células Fy(a-b-).(Albrey, Vincent et al. 1971)

Outro antígeno raro, Fy4, foi inicialmente identificado no soro de uma menina afro-descendente Fy(a+b+) com AF que com histórico de uma série de transfusões sanguíneas. Seu anticorpo é capaz de aglutinar hemácias em indivíduos Fy(a-b-) e na maioria dos indivíduos com os fenótipos Fy(a+b-) ou Fy(a-b+). (Behzad, Lee et al. 1973)

Apesar de muito raro, o Fy5 pode ser definido a partir de anti-soro não reagente com eritrócitos Fy(a-b-), mas que aglutina hemácias com antígeno Fy^a e/ou Fy^b, caracteristicamente não é encontrado em hemácias com fenótipo Rh nulo. Acredita-se, então, que o antígeno Fy5 resulte de uma interação entre produtos gênicos dos sistemas Duffy e Rh, ambos resultantes de locos presentes no cromossomo número 1. (Colledge, Pazzulich et al. 1973)

Em 1987, foi relatada a produção do primeiro anticorpo monoclonal murino, anti-Fy6. Este, por sua vez, não reage com hemácias Fy(a-b-) e sim com eritrócitos Fy(a+b-), Fy(a+b+) e Fy(a-b+), em uma frequência semelhante ao Fy3, porém com sensibilidade à degradação pela enzima quimiotripsina, ao contrário dos antígenos Fy^a e Fy^b que são destruídos pelo tratamento com quimiotripsina ou papaína. O Fy6 também está relacionado à suscetibilidade de invasão do parasita *Plasmodium vivax*.(Nichols, Rubinstein et al. 1987)

Em 1965, Chown et al descreveram um novo alelo no locus do *DUFFY*, *FY*X*, que está associado à fraca expressão do Fy^b . O fenótipo resultante, denominado Fy^x , ocorre devido á presença de mutação de ponto no gene *FY*B*. (Chown, Lewis et al. 1965)

A presença de Fy^{bfraco} está associada à menor expressão dos antígenos $Fy3$, $Fy5$ e $Fy6$, em indivíduos homozigotos para *FY*B^{fraco}*. (Habibi, Perrier et al. 1980) A freqüência alélica encontrada para o *FY*B^{fraco}* é de aproximadamente 0,02 entre caucasóides e nula entre afro-descendentes. (Chown, Lewis et al. 1965; Yazdanbakhsh, Rios et al. 2000)

Quanto à sua distribuição, Sanger et al observaram que o fenótipo $Fy(a-b-)$ era mais comum em afro-descendentes, e que provavelmente representava um produto silencioso.(Sanger, RR; et al. 1955) Já Mourant et al constataram que em grupos raciais específicos (caucasóides, esquimós, indígenas sul americanos e algumas populações da Índia e do Paquistão) são encontrados os fenótipos: $Fy(a+b-)$, $Fy(a+b+)$ e $Fy(a-b+)$. Este estudo mostrou também que o antígeno Fy^a é encontrado em alta freqüência na Ásia, chegando próximo de 100% em algumas populações enquanto que, em indivíduos afro-descendentes e afro-descendentes, sua freqüência é baixa (10 a 20%). (Mourant, Kopec` et al. 1976)

No Brasil, estudo realizado por Novaretti et al em doadores de sangue da cidade de São Paulo, observou freqüência de 19,8% do fenótipo $Fy(a+b-)$ em caucasóides e de 14% em afro-descendentes. Para os outros fenótipos as freqüências encontradas foram: $Fy(a+b+)$ 41,4% em caucasóides e 1,6% em afro-descendentes; $Fy(a-b+)$ 37,8% em caucasóides e 1,6% em afro-

descendentes; e Fy(a-b-) 1,1% em caucasóides e 66,9% em afro-descendentes. (Novaretti, Dorlhiac-Llacer et al. 2000)

2.2.1 Glicoproteína Duffy:

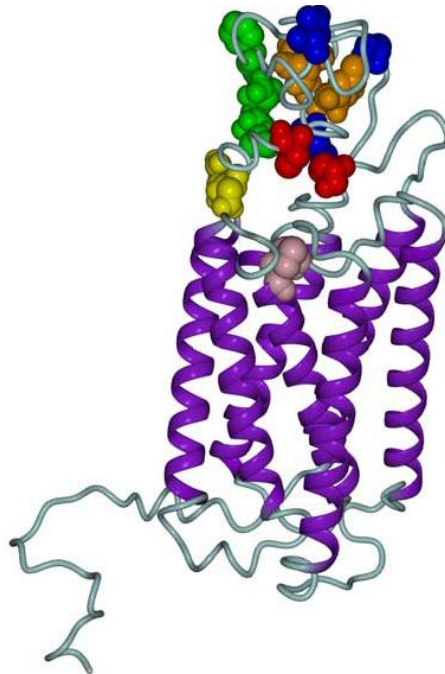
A glicoproteína responsável pela expressão dos antígenos Duffy nos eritrócito, glicoproteína Duffy (GPD), foi descrita pela primeira vez em 1982 por Moore et al. (Moore, Woodrow et al. 1982)

A GPD apresenta massa molecular entre 35 e 43kDa e é composta por 336 aminoácidos. É constituída de sete hélices hidrofóbicas com um domínio amino-terminal extra-celular, três alças extra-extracelulares, três alças citoplasmáticas e um domínio coxí-terminal citoplasmático, isso demonstra que a GPD é uma proteína de sete passagens transmembrânicas. (Chaudhuri, Polyakova et al. 1993; Neote, Mak et al. 1994; de Brevern, Wong et al. 2005)

Os epítomos Fy^a, Fy^b e Fy6 estão localizados no domínio extracelular da GPD, o Fy3 na terceira alça extracelular. (Philippson 2002; de Brevern, Wong et al. 2005). A figura 1 mostra a distribuição desses antígenos.

A GPD é expressa em outros tecidos: medula óssea, rim, baço, coração, músculo, duodeno, pâncreas, placenta e células Purkijie do cerebelo. (Chaudhuri, Polyakova et al. 1993; Neote, Mak et al. 1994; Chaudhuri, Polyakova et al. 1995). Os indivíduos que tem o gene *DUFFY* não expresso nas células eritróides também não expressam os antígenos na medula óssea (Chaudhuri, Polyakova et al. 1995).

Figura 1: Representação em 3 dimensões de modelo GPD compacto utilizando software Dino.(Philippsen 2002)



Legenda: Os resíduos de interesse estão marcados em cores: Verde: antígeno Fy6; Laranja: antígenos Fy^a/Fy^b e Amarelo: antígeno Fy3.

2.2.2 Receptor de quimiocinas:

As quimiocinas são uma grande família de citocinas quimiotáticas, cujo papel é atrair elementos leucocitários aos sítios de inflamação. São divididas em duas grandes subfamílias e se diferenciam por dois resíduos cisteína de aminoácidos terminais que participam na ligação dissulfeto. Podem estar adjacentes (quimiocinas C-C) ou separados por um aminoácido (quimiocinas C-X-C). As quimiocinas dessas subfamílias são produzidas por leucócitos e por

vários tipos de células teciduais como as endoteliais, epiteliais e fibroblastos.
(Rollins 1997; Walz, Calandra et al. 2003)

Na inflamação aguda, as quimiocinas C-X-C atuam principalmente sobre os neutrófilos, e, na inflamação crônica, as quimiocinas C-C atuam principalmente sobre monócitos, linfócitos e eosinófilos.(Abbas, Lichtman et al. 2003)

Cada quimiocina tem um receptor específico ao qual se liga com alta afinidade. Em Darbonne et al descobriram um novo receptor de quimiocinas nos eritrócitos, que era ligante da família C-X-C com alta afinidade para MGSA (fator estimulador da atividade de melanócito) e, principalmente, para Interleucina-8 (IL-8), e C-C com alta afinidade para MCP-1 (Proteína Quimotática de Monócito), MIP-1 (Proteína Inflamatória de Macrófago 1) e RANTES (Células Expressas e Secretadas Reguladas na Ativação).(Darbonne, Rice et al. 1991; Dohlman, Thorner et al. 1991; Horuk, Colby et al. 1993)

Horuk et al mostraram, em um estudo sobre receptores de quimiocinas multiespecíficos em eritrócitos humanos, que a IL-8 liga-se minimamente a eritrócitos Duffy negativos, que anticorpos monoclonais para antígenos Duffy bloqueavam a ligação de IL-8 em eritrócitos Duffy positivo, e que a IL-8 também impedia a ligação e a invasão por *P. knowlesi* em hemácias, indicando que os antígenos de grupo sanguíneo Duffy são receptores de quimiocinas, identificando a chamada DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines).
(Darbonne, Rice et al. 1991; Horuk, Chitnis et al. 1993)

A presença do DARC nas células endoteliais das vênulas pós-capilares aliada à sua capacidade de fixar as quimiocinas sugere que essa proteína possa ter um papel na cascata inflamatória, participando na formação do gradiente de quimiocinas que estimula o deslocamento dos granulócitos para os sítios de inflamação.(Tournamille 2000)

A IL-8 é uma molécula de baixo peso molecular (8kDa), produzida por células endoteliais e macrófagos e indutora de quimiotaxia para neutrófilos. Após sua introdução na circulação, a IL-8 liga-se ao DARC ficando incapaz de ativar neutrófilos e assim, o DARC funcionaria como “escoadouro” desta interleucina da circulação. (Van der Laken, Boerman et al. 1998)

2.2.3 Gene *DUFFY*

O gene *DUFFY* localiza-se no braço longo de cromossomo 1 na região 1q22-23. É constituído por 1.572 nucleotídeos, distribuídos em 2 exons e 1 intron. O éxon 1 apresenta 55 nucleotídeos codificando sete aminoácidos. O íntron apresenta 479 nucleotídeos, enquanto o exon 2 tem 1.038 nucleotídeos e codifica 329 aminoácidos.(Iwamoto, Omi et al. 1995)

Os antígenos Fy^a e Fy^b são codificados por duas formas alélicas do gene *DUFFY*. Diferem entre si por uma única troca de base no nucleotídeo 125: presença de guanina (G) no alelo *FY*A* e de adenina (A) no *FY*B*, (G>A). Essa substituição acarreta a troca do aminoácido glicina por ácido aspártico, respectivamente, na posição 42 da GPD. (Chaudhuri, Polyakova et al. 1995; Iwamoto, Omi et al. 1995). A combinação de expressão dos alelos dá origem

aos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+).(Tournamille, Le Van Kim et al. 1995)

O fenótipo Fy(a-b-) apresenta bases moleculares diferentes e estas são responsáveis pelo encontro de frequências discrepantes deste fenótipo em afro-descendentes e caucasianos. (Meny 2010)

Em afro-descendentes, o alelo mutado é idêntico ao alelo *FY*B* em sua base molecular, porém com uma única troca de base, timina por citosina na posição -33 (-33T>C), no fator de transcrição eritróide GATA-1 da região promotora do gene. Nesses casos, o antígeno Fy^b é expresso em células não eritróides, mas não nas hemácias. Com isso, observa-se discrepância entre os fenótipos Duffy obtido através de reação com antisoros [Fy(a-b-)] e a análise realizada por biologia molecular [*FY*B*]. (Tournamille, Colin et al. 1995; Meny 2010) É importante ressaltar que a presença da mutação -33T>C na forma heterozigota está associada a diminuição da expressão deste antígeno nos eritrócitos.(Zimmerman, Woolley et al. 1999)

Em caucasianos, a base molecular para o fenótipo Fy(a-b-) é diferente. Nestes indivíduos, ocorre a não expressão da proteína Duffy tanto em eritrócitos quanto nos outros tecidos. Nos raros casos documentados, foram identificadas mutações de ponto codificando “*stop codons*” prematuros para ambos os alelos, *FY*A* e *FY*B*. Com isso, as proteínas traduzidas apresentam-se instáveis e de rápida degradação. (Rios, Chaudhuri et al. 2000)

A genotipagem do *DUFFY* é útil em pacientes que necessitam de transfusões crônicas. Os indivíduos que apresentam fenótipo Fy(a-b-) devido a

mutação do GATA no alelo *FY*B* podem receber hemácias Fy(b+) sem risco de desenvolverem anti-Fy^b ou anti-Fy3. (Castilho 2007) Entretanto, os caucasianos Fy(a-b-) tendem a formar anti-Fy3, ou seja, são capazes de desenvolver resposta imune se transfundidos com hemácias Fy(b+), devendo somente receber hemácias Fy(b-).(Albrey, Vincent et al. 1971; Rios, Chaudhuri et al. 2000)

Outras mutações no alelo *FY*B* resultam em fenótipos característicos. No alelo *FY*B^{fraco}* ou *FY*X* ocorre mutação de ponto no nucleotídeo 265, troca da citosina (C) por timina (T), (265C>T), levando a substituição do aminoácido arginina por cisteína (Arg89Cys) na posição 89 da GPD. (Tournamille, Le Van Kim et al. 1998)

Outras mutações no alelo *FY*B* tem sido pontuadas como associadas ao *FY*B^{fraco}*. Olsson et al analisando amostras de indivíduos não aparentados com fenótipos Fy(a+b+^{fraco}) e Fy(a-b+^{fraco}), observaram que a troca de bases 298G>A (Ala100Thr) poderia estar associada a este fenótipo.(Olsson, Smythe et al. 1998) Análise posterior, entretanto, questiona a importância desta troca de bases, sugerindo tratar-se de um polimorfismo. Neste trabalho, Yazdanbakhsh et al. demonstraram que a presença da 298G>A não alterou a expressão do Duffy, esta troca foi encontrada sempre associada à 265C>T e, além disso, apresentou alta frequência populacional (próxima a 30%) em mais de um grupo racial. Assim, estes autores sugerem que a mutação 265C>T seria a mutação crítica e responsável pela expressão fraca do antígeno Duffy. (Yazdanbakhsh, Rios et al. 2000)

A ocorrência do alelo FY^*A^{nulo} é rara e resulta na ausência da expressão do antígeno Fy^a . Este alelo foi encontrado em regiões endêmicas de malária como Papua na Nova Guiné e Amazonas no Brasil. (Zimmerman, Woolley et al. 1999; Langhi Jr, Albuquerque et al. 2004)

2.2.4 Receptor para Malária:

Além de ser considerada receptora de citocina, a GPD também é a receptora eritrocitária do *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) e do *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*). (Miller, Mason et al. 1975; Barnwell, Nichols et al. 1989)

Trabalhos iniciais sugeriram que os eritrócitos humanos $Fy(a-b-)$ eram resistentes à invasão pelo *P. knowlesi*, causador da malária em macacos. (Miller, Mason et al. 1975) Estudos posteriores mostraram que o *P. vivax* também era incapaz de invadir hemácias $Fy(a-b-)$. (Barnwell, Nichols et al. 1989). Esse evento ocorre devido a uma proteína do *P. vivax*, a PvDbp (*P. vivax* Duffy-binding protein / proteína Duffy associada ao *P. vivax*) que interage com o antígeno Duffy da hemácia, permitindo a infecção do eritrócito pelo parasita. (King, Michon et al. 2008)

Estes resultados levaram à hipótese de que o indivíduo $Fy(a-b-)$ apresentaria uma vantagem seletiva, na qual seus eritrócitos seriam resistentes à invasão pelo *P. vivax*. Esta hipótese fica evidente no Oeste da África, onde o *P. vivax* encontra-se ausente e 95% da população é $Fy(a-b-)$. Entretanto, existem contradições que necessitam ser elucidadas, tais como o fato de o fenótipo $Fy(a-b-)$ não ser comum no Sudeste da Ásia, área endêmica do *P. vivax*. (Pogo and Chaudhuri 2000; Langhi and Bordin 2006)

No Brasil, através de técnicas moleculares, Langhi demonstrou que os indivíduos com fenótipo / genótipo $Fy(a+b+) / FY^*A/FY^*B$ e $Fy(a-b+) / FY^*B/FY^*B$ tem mais chances de adquirir malária pelo *P. vivax* do que os que apresentam as combinações $Fy(a+b-) / FY^*A/FY^*A$ e $Fy(a+b-) / FY^*A/FY^*B$. Esse mesmo trabalho mostrou que os indivíduos homocigotos para a mutação -33T>C eram 100% resistentes à infecção do *Plasmodium vivax*.(Langhi Jr 2004)

2.3 Anemia falciforme e antígeno Duffy:

Como referido acima, a expressão do antígeno Duffy nos eritrócitos tem potencial de promover acentuado recrutamento de leucócitos, bem como evitar a liberação inadvertida de quimiocinas, em especial a IL-8, neutralizando-as no sangue. Por outro lado, indivíduos afro-descendentes apresentam predomínio do fenótipo $Fy(a-b-)$, resultando em maior frequência deste fenótipo em indivíduos com anemia falciforme. Com isso, postula-se que estes pacientes teriam menor *clearance* de IL-8 e, como consequência, aumento de seus níveis séricos, implicando em uma associação de fenótipo Duffy-Negativo e maior agravamento de crises, como a oclusão vascular.(Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

Os resultados a este respeito, entretanto, são escassos e controversos. Schnog et al avaliaram 51 indivíduos com doença falciforme de acordo com o fenótipo Duffy, negativo e positivo. Estes autores não observaram significância estatística nas manifestações clínicas (crises vaso oclusivas, crise algica, síndrome torácica aguda e úlcera de membro inferior) entre os dois grupos.

Nesse mesmo estudo, não se observou diferença estatística do nível sérico de IL-8 entre os grupos.(Schnog, Keli et al. 2000)

Afenyi-Annan et al analisando 237 portadores de AF, observaram que aqueles que apresentavam genótipo Duffy-Negativo (73,4%) tiveram forte associação com dano tecidual crônico, em especial com proteinúria. Estes autores concluíram que a genotipagem *DUFFY* poderia ser um potencial biomarcador de desenvolvimento de necrose tecidual nestes pacientes, em especial de disfunção renal.(Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

Estudo em 212 pacientes portadores de AF, onde 76,9% eram Duffy-Negativo, mostrou uma tendência ao aumento da contagem de reticulócitos e da dosagem de desidrogenase láctica nos pacientes Duffy-Positivo em relação aos Duffy-Negativo. Neste mesmo estudo, a dosagem sérica de IL-8 estava elevada nos pacientes Duffy-Positivo (4.46 ± 1.22 pg/mL) em comparação aos Duffy-Negativo (1.47 ± 0.5 pg/mL) $p= 0.02$.(Nebor, Durpes et al. 2010)

3 Casuística

Os pacientes portadores de AF convidados a participar do estudo estavam em acompanhamento regular no ambulatório de hemoglobinopatias da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM) durante o período de Junho de 2009 a Junho de 2010.

Os critérios de inclusão consistiram de pacientes portadores de AF fora de crises, em acompanhamento ambulatorial regular, e maiores de 18 anos. Foram excluídos pacientes que se apresentaram com quadro infeccioso, gestação em curso, transfusão crônica ou que tenham recebido transfusão de glóbulos vermelhos nos últimos 3 meses antes da coleta.

Assim, foram incluídos 90 indivíduos em acompanhamento ambulatorial com diagnóstico de homozigose para HbS ou dupla heterozigose: S-beta-Talassemia.

4 Métodos

4.1 Análise laboratorial e clínica:

4.1.1 Análise laboratorial

- ✓ Hemograma completo realizado por automação (Cell Dyn 3500 - Abbott Laboratories®).
- ✓ Eletroforese hemoglobina realizada em fita de acetato celulose, pH= 8,0, seguida de leitura em espectrofotômetro após eluição (Marengo-Rowe 1965)
- ✓ Hemoglobina fetal (HbF) foi avaliada através de desnaturação alcalina (método de Betke).(Pembrey, McWade et al. 1972)
- ✓ Contagem de reticulócitos a partir de coloração supra vital com azul de cresil brilhante
- ✓ Desidrogenase láctica (DHL) realizada por automação (ADVIA 1650 - Bayer®).

4.1.2 Análise por método de imagem

- ✓ Determinação de elevação da pressão artéria pulmonar (PAP)

Os pacientes foram submetidos à ecocardiograma Doppler transtorácico, realizado pela Disciplina de Cardiologia da UNIFESP, Setor de Ecocardiografia. Estes foram realizados com os aparelhos ATL Phillips® HDI 5000 CV e General Electric, modelo Vivid-3, com transdutor de banda larga P4-2 Mhz, na modalidade de ecocardiografia transtorácica. A pressão sistólica da artéria pulmonar foi estimada pelo ecocardiograma com Doppler através da medida do

jato de regurgitação tricúspide (VT: velocidade tricúspide em m/s). A equação de Bernoulli [$Dp= 4(VT)^2$] foi utilizada para converter esta medida de fluxo em uma estimativa de pressão, adicionando-se, a esta, a pressão do átrio direito. A medida da pressão do átrio direito não possui uma padronização, normalmente é estimada pelo calibre e variação respiratória da veia cava inferior em valores entre 5 a 20 mmHg. Os pacientes com valores de pressão sistólica de artéria pulmonar iguais ou superiores a 30mmHg foram considerados portadores de PAP.(Carvalho, Almeida et al. 2005)

4.1.3 Análise de manifestações clínicas:

- ✓ Priapismo

A presença desta manifestação baseou-se na aplicação de questionário específico nos pacientes do sexo masculino. (Apêndice A)

- ✓ Osteonecrose (ON)

A determinação da presença ou não de ON de cabeça de fêmur foi feita através de exame radiográfico e/ou de ressonância magnética de fêmur.

- ✓ Síndrome Torácica Aguda (STA)

Dados obtidos pela análise de prontuários, avaliando presença de quadros de pneumonia e dor torácica, indicativos de STA, associados a alterações na Radiografia de Tórax e oximetria.

- ✓ Úlcera em Membros Inferiores (UMI)

Nos pacientes foi avaliada a presença de UMI ou evidências de úlceras antigas cicatrizadas. Essa observação foi realizada pela autora ou por outro membro da equipe participante do estudo.

- ✓ Acidente Vascular Encefálico (AVE)

Foram considerados como pacientes com diagnóstico de AVE, os casos em que houve comprovação clínica e/ou radiológica dessa complicação.

4.1.4 Análise do uso de hidroxiuréia:

Todos os pacientes foram avaliados, a partir de dados de prontuário, quanto ao uso de hidroxiuréia, pelo menos 3 meses anteriores à data de coleta das amostras. Os critérios de prescrição de HU seguiram os determinados pelo “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas na Doença Falciforme (Hidroxiuréia)”, que pode ser acessado em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/falciforme_pcdt.pdf

4.2 Análise do sistema Duffy

4.2.1 Coleta e processamento do material:

As amostras foram coletadas durante as consultas de rotina do Ambulatório de Anemias da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP/EPM.

Foram coletadas por punção venosa uma amostra de 5mL de sangue total em tubo seco, sem anticoagulante, e duas amostras de sangue total em tubos de 3mL contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 3,4mg/mL.

As amostras de sangue que foram utilizadas para a fenotipagem dos antígenos eritrocitários Fy^a e Fy^b, do sistema Duffy, foram processadas imediatamente após a coleta, através do método de aglutinação em gel (DiaMed Latino América S.A) e, a uma amostra de sangue total com EDTA foi aliqüotada em tubos de Eppendorf e armazenada em congelador a -20°C até a fase de extração de DNA.

4.2.2 Fenotipagem eritrocitária:

Para a realização do método de aglutinação em gel, foi utilizado uma amostra de sangue contendo EDTA, que por sua vez, foi submetida a uma centrifugação de 3.400rpm (Eppendorf Centrifuge 5403) por 1 minuto, para a separação das frações plasmáticas e celular.

Em um tubo, limpo e seco, foi adicionado 10µL das hemácias separadas a 1mL de solução diluente de baixa força iônica (ID-Diluente 2 – DiaMed- Latino América S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil), para o preparo de suspensão de hemácias a 0,8% . Adicionou-se 50µL de soro reagente anti-Fy^a (ID-Diluente 2 – DiaMed- Latino América S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil) aos microtubos contendo gel neutro do sistema de cartão de aglutinação e soro antiglobulina humana poliespecífica (anti- IgG de coelho e anti-C3d monoclonal). Em outro cartão de aglutinação foi realizado o mesmo processo, porém, adicionando o soro reagente Fy^b (ID-Diluente 2 – DiaMed- Latino América S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os cartões foram incubados (DiaMed, ID Incubator 37 SII) a 37°C por 15 minutos e após a incubação foram centrifugados (DiaMed ID Centrifuga) a 3400 rpm por 10 minutos.

Os cartões foram avaliados macroscopicamente e as amostras que apresentaram células aglutinadas, formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel, foram consideradas positivas e classificadas em cruzes (+ a ++++), indicando a presença do antígeno correspondente. Quando ocorreu a formação de um botão compacto no fundo do microtubo, este foi considerado negativo para a presença do antígeno.

4.2.3 Extração de DNA:

O DNA foi extraído a partir de uma amostra de 3mL de sangue total, colhida em EDTA. As amostras foram aliqotada em tubos de Eppendorf e armazenadas a -20°C até a extração propriamente dita.

Foi utilizada técnica de extração de DNA descrita por Lee Sakahara et al. que consiste em 3 fases: lise das hemácias, extração e purificação do DNA. As soluções necessárias para o procedimento e a descrição da técnica estão descritas no Apêndice B. (Lee, Sakahara et al. 1998)

A quantificação da concentração de DNA obtido e resuspensão em água bidestilada foi feita em aparelho NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies[®], Thermo Scientific, Wilmington, USA).

As amostras que tiveram uma concentração maior que 100ng/ μ L, foram submetidas a uma nova diluição para que todas tivessem a mesma concentração.

4.2.4 Genotipagem dos alelos do gene *FY*B* e da região promotora:

Para a determinação do genótipo *DUFFY* foi realizada técnica de reação em cadeia da polimerase, (PCR *Polymerase Chain Reaction*) (Saiki, Gelfand et al. 1988) seguida de digestão enzimática (PCR-RFLP *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism/* Reação em Cadeia de Polimerase – Análise de polimorfismo a partir de digestão enzimática). Os polimorfismos analisados foram: *rs12075* (125G>A) que identifica os alelos *FY*A* e *FY*B*; *rs34599082* (265C>T) e *rs13962* (298G>A) que caracterizam o

*FY*B^{fraco}* e *rs2814778* (-33T>C) na região promotora *FY*B* -33. (Castilho, Rios et al. 2004)

4.2.4.1 Amplificação do gene *DUFFY*:

Para genotipagem do *DUFFY* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, localizados no exon 2 de forma a flanquear a região de interesse. A sequência dos *primers* está relacionada na tabela 1. (Castilho, Rios et al. 2004)

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados na genotipagem do gene *DUFFY*.(Castilho, Rios et al. 2004)

Primers	Sequência de nucleotídeos	Produto
<i>FY*B1- senso</i>	5'- TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC -3'	392pb
<i>FY*B2- antisenso</i>	5'- AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC -3'	

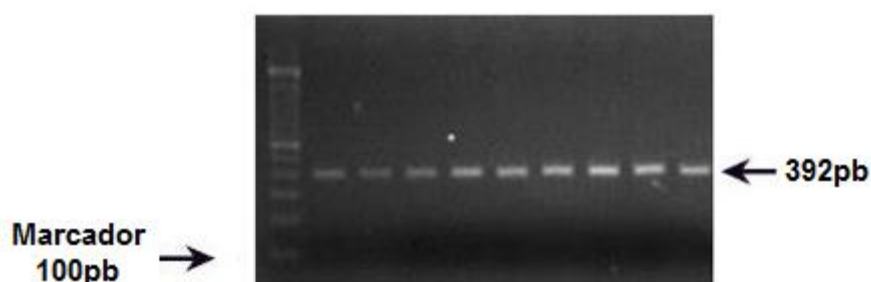
pb = pares de bases

A PCR para a amplificação do gene *DUFFY*, para um volume final de 60µL, foi realizada com 2µL DNA genômico na concentração de 100ng/µL; 1,8µL de MgCl₂ 50 mM; 1µL da mistura de dNTP 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,300µL da enzima da Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil); 5µL de cada *primer* (50 pmol); 6µL do tampão específico fornecido pelo fabricante (Invitrogen, Brasil) e 38,9µL de H₂O destilada. Foi utilizado aparelho termociclador (PTC 200, Bio Rad, USA) nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 59°C por 30 segundos e extensão de do

fragmento de DNA a 72°C por 30 segundos. A extensão final dos fragmentos de DNA foi a 72°C por 10 minutos.

A visualização do produto amplificado de 392pb foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2% com voltagem de 100 V, corado com brometo de etídio (0,1µL/mL, BioAgency) utilizando-se marcador de base de 100 pares de bases (pb) (DNA 100 Ladder, Invitrogen), em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) conforme mostra a Figura 2.

Figura 2: Eletroforese da amplificação do exon 2 do gene *DUFFY* em gel de agarose 2%.



Para identificação do polimorfismo *rs12075* (125G>A), e das mutações *rs34599082* (265C>T) e *rs13962* (298G>A), após a obtenção do produto da PCR foi realizada a digestão deste com enzimas específicas: *BanI*, *MspA1I*, e

*Mwo*I, respectivamente (New England Biolabs, Beverly, MA or MBI Fermentas, Amherst, NY).(Castilho, Rios et al. 2004)

4.2.4.2 Digestão enzimática *Ban*I:

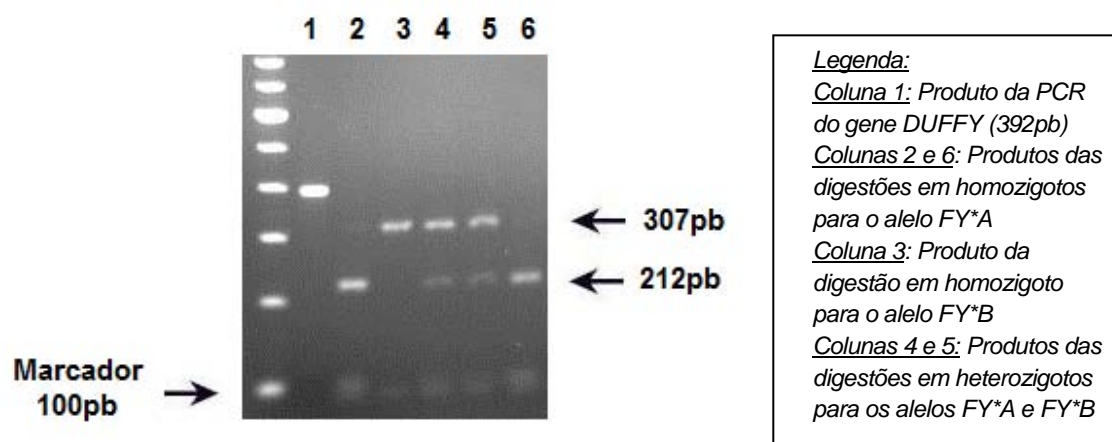
Para a identificação do polimorfismo *rs12075* (125G>A), que diferencia os alelos *FY*A* e *FY*B*, foi utilizada a enzima de restrição *Ban*I (New England Biolabs, Beverly, MA or MBI Fermentas, Amherst, NY) que reconhece o seguintes nucleotídeos na posição 125:

5`...G↓G Y R C C...3`

3`..C C R Y G↑G...5`

Na digestão com a enzima *Ban*I, 10µL do produto da PCR foi adicionada a uma nova mistura de volume final de 20µL que continha: 2µL tampão de reação (10X); 0,25µL de solução BSA (solução bovino fetal); 0,25µL da enzima de restrição *Ban*I e 7,5µL e de H₂O. As amostras foram incubadas a 37°C por 18 horas em um termomixer. O resultado da digestão foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, em 80V, corada com brometo de etídio (0,1µL/mL, BioAgency) com marcador de base de 100 pares de bases (DNA 100 Ladder, Invitrogen) e visualizada em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) conforme a Figura 3.

Figura 3: Foto da eletroforese em gel de agarose da digestão com a enzima *BanI* do produto da PCR do exon 2.



4.2.4.3 Digestão enzimática *MspA1I*:

A caracterização do alelo *FY*B^{fraco}* foi realizada com o uso da enzima *MspA1I* (New England Biolabs, Beverly, MA or MBI Fermentas, Amherst, NY) que reconhece os seguintes sítios específicos para a mutação *rs34599082* (265C>T) no exon 2 do gene *DUFFY*:(Castilho, Rios et al. 2004)

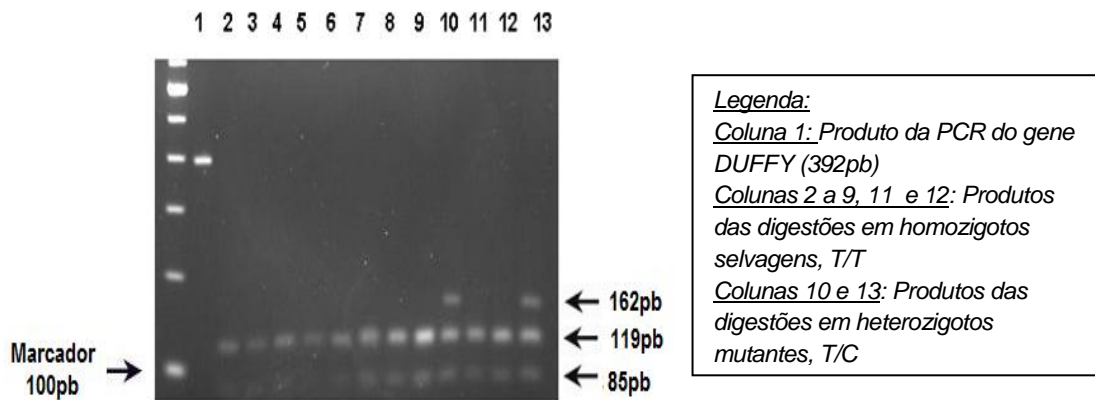
5`...C M G↓C K G...3`

3`...G K C↑G M C...5`

Na digestão com a enzima *MspA1I*, 10µL do produto da PCR foi adicionada a uma nova mistura de volume final de 20µL que continha: 2µL tampão de reação (10X); 0,5µL de solução BSA (solução bovino fetal); 0,5µL da enzima de restrição *MspA1I* e 7,0µL de H₂O. As amostras foram incubadas a 37°C por 18 horas em um termomixer. O resultado da digestão foi analisado através de

eletroforese em gel de agarose a 2%, em 80V, corada com brometo de etídio (0,1µL/mL, BioAgency) com marcador de base de 100 pares de bases (DNA 100 Ladder, Invitrogen) e visualizada em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) conforme a figura 4.

Figura 4: Foto da eletroforese em gel de agarose da digestão com a enzima *MspA1I* do produto da PCR do exon 2.



4.2.4.4 Digestão enzimática *Mwo*:

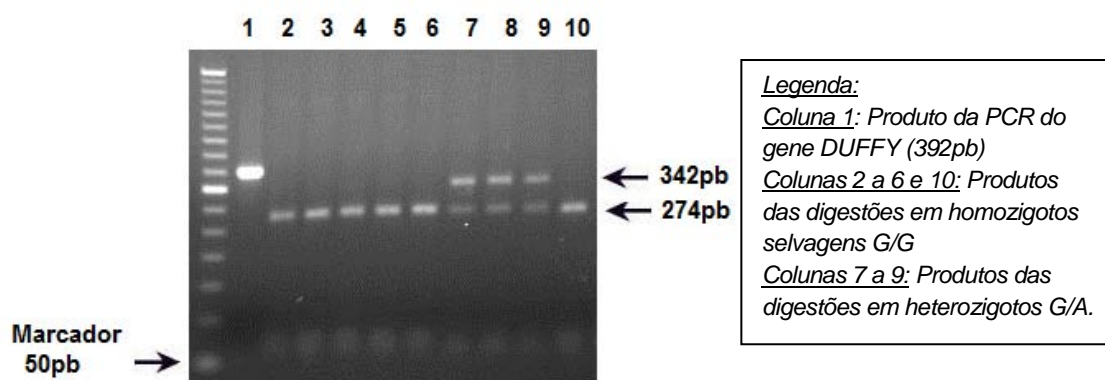
A *Mwo*, (New England Biolabs, Beverly, MA or MBI Fermentas, Amherst, NY), que reconhece os seguintes sítios específicos para a mutação *rs13962* (298G>A), do exon 2 do gene *DUFFY*, gerando fragmentos que caracterizam o alelo *FY*B^{fraco}*:(Castilho, Rios et al. 2004)

5`...G C N N N N N N N N G C...3`

3`...C G N N N N N N N C G...5`

Na digestão com a enzima *Mwo*, 10µL do produto da PCR foi adicionada a uma nova mistura de volume final de 20µL que continha: 2µL tampão de reação (10X); 1µL da enzima de restrição *Mwo* e 7,0µL e de H₂O. As amostras foram incubadas a 60°C por 18 horas em um termomixer. O resultado da digestão foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 2%, em 80V, corada com brometo de etídio (0,1µL/mL, BioAgency) com marcador de base de 50 pares de bases (DNA 100 Ladder, Invitrogen) e visualizada em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) conforme a figura 5.

Figura 5: Foto da eletroforese em gel de agarose da digestão com a enzima *MwoI* do produto da PCR do exon 2.



4.2.5 Genotipagem GATA:

Para a análise da região promotora GATA, onde ocorre uma troca de base -33T>C (*rs2814778*), que caracteriza o alelo *FY*B-33* foi utilizado *primers* descritos na tabela 2 conforme (Castilho, Rios et al. 2004)

Tabela 2: Sequência de *primers* iniciadores utilizados na genotipagem do GATA.(Castilho, Rios et al. 2004)

Primers	Sequência de nucleotídeos	Produto
<i>FY*N1 – senso</i>	5'- CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA -3'	189pb
<i>FY*N2 - antisenso</i>	5'- CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG – 3'	

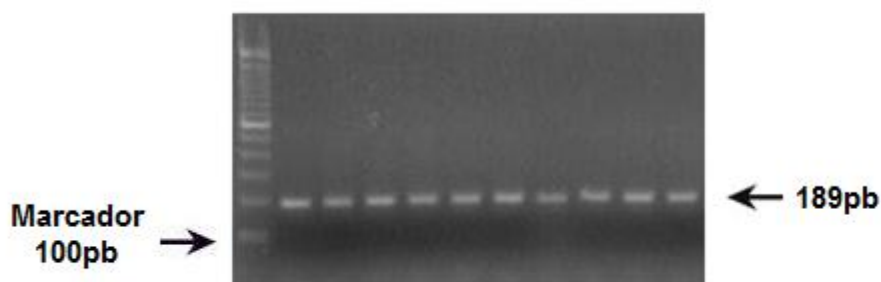
pb: pares de base

A PCR para a região promotora GATA, para um volume final de 25µL, foi realizada com 2µL DNA genômico na concentração de 100ng/µL; 0,75µL de

MgCl₂ 50 mM; 0,5µL da mistura de dNTP 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,125µL da enzima da Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil); 5µL de cada *primer* (50 pmol); 2,5µL do tampão específico fornecido pelo fabricante (Invitrogen, Brasil) e 9,125µL de H₂O destilada. Foi utilizado aparelho termociclador (PTC 200, Bio Rad, USA) nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 59°C por 30 segundos e extensão de do fragmento de DNA a 72°C por 30 segundos. A extensão final dos fragmentos de DNA foi a 72°C por 10 minutos.

A visualização do produto amplificado de 189pb foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2% com voltagem de 100 V, corado com brometo de etídio (0,1µL/mL, BioAgency) utilizando-se marcador de base de 100 pares de bases (pb) (DNA 100 Ladder, Invitrogen), em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) conforme mostra a Figura 6.

Figura 6: Eletroforese da amplificação da região promotora GATA em gel de agarose 2%.



Após a realização pela amplificação por meio de reações de PCR, submeteu-se à digestão enzimática.

4.2.5.1 Digestão enzimática *StyI*:

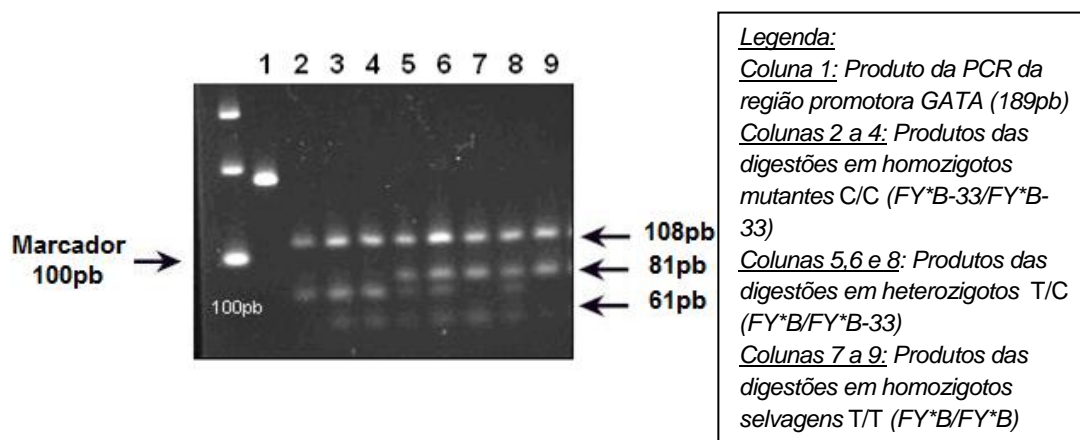
A *StyI* (New England Biolabs, Beverly, MA ou MBI Fermentas, Amherst, NY), reconhece os seguintes sítios específicos para a mutação *rs2814778* (-33 T>C), que caracterizam o alelo *FY*B* -33.(Castilho, Rios et al. 2004)

5`...C↓C W W G G...3`

3`...G G W W C↓C...5`

Na digestão com a enzima *StyI*, 10µL do produto da PCR foi adicionada a uma nova mistura de volume final de 20µL que continha: 2µL tampão de reação (10X); 0,5µL de solução BSA (solução bovino fetal); 0,5µL da enzima de restrição *StyI* e 7,0µL de H₂O. As amostras foram incubadas a 37°C por 18 horas em um termomixer. O resultado da digestão foi analisado através de eletroforese em gel de *Low Melting* a 2%, em 80V, corada com brometo de etídio (0,1µL/mL, BioAgency) com marcador de base de 50 pares de bases (DNA 100 Ladder, Invitrogen) e visualizada em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) conforme a figura 7.

Figura 7: Foto da eletroforese em gel de *Low Melting* da digestão com a enzima *StyI* do produto da PCR da região promotora GATA.



4.3 Seqüenciamento:

O seqüenciamento foi realizado com o objetivo de confirmar a análise genotípica realizada por PCR-RFLP. Para isso, foram escolhidas amostras aleatórias e, em todos os casos estudados, o resultado foi coerente.

Para o seqüenciamento do exon 2 e da região promotora do gene *DUFFY*, procedeu-se a novas reações de PCR, com os primers específicos da região de interesse, seguido de purificação do produto obtido com *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare, Piscataway, UK), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para o cálculo da quantidade de produto da PCR purificado necessário para o seqüenciamento, procedeu-se à quantificação do DNA obtido através de eletroforese em gel de agarose com a utilização de marcador específico para quantificação de peso molecular (High DNA Mass ladder, Invitrogen). A coloração do gel com brometo de etídio

(0,1µL/mL BioAgency) permitiu sua visualização em sistema de fotodocumentação (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA,USA).

Confirmada a purificação do produto da PCR e realizada sua quantificação, foi iniciada a reação de seqüenciamento em placa com 96 poços. Para um volume final de 20µL, utilizou-se quantidade de amostra equivalente a uma concentração de 40ng do produto purificado; 3,3uM dos oligonucleotídeos descritos nas tabelas 2 (exon 2) ou 3 (região promotora) segundo o interesse; 4,0µL de tampão específico do fabricante e 1,5µL de BigDye® (Big Dye Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem, CA USA), protegida da luz.

As reações de PCR, realizadas em termociclador (PTC 200, Bio Rad, USA), constituíram-se de 25 ciclos compostos por: desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão por 4 minutos. Em seguida o produto foi submetido à precipitação com adição de 1µL de acetato de sódio 3,0M (PH 4,3) e 25µL de etanol absoluto em cada amostra. Após encubação de 15 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz, foram centrifugadas a 3.400 rpm por 45 minutos. Posteriormente, a placa foi invertida sobre papel absorvente e procedeu-se a nova centrifugação com a placa invertida a 900 rpm por 1 minuto. Após adição de 150µL de etanol 70% em cada poço, foi realizada nova centrifugação a 900 rpm por 15 minutos, repetindo-se o processo de inversão da placa e centrifugação descrito acima porém em rotação de 150 rpm. Finalmente, cada produto foi ressuspensão em 12µL de formamida HI, a placa foi selada e realizada nova desnaturação, a 95°C por 5 minutos, seguida de imersão em gelo por 2 minutos.

A leitura dos resultados foi feita em Sequenciador Automatizado (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystem, CA, USA) e sua análise realizada com auxílio do editor BioEdit (Biological sequence alignment editor, Carslab, CA, USA) sempre comparando com a sequência de referência do GeneBank para o gene *DUFFY*. As figuras 8, 9 e 10 mostram exemplos de análises parciais do seqüenciamento.

Figura 8: Eletroesferograma da região do polimorfismo *rs12075* (125G>A) no exon 2, exemplificando a identificação dos alelos: *FY**/*FY**A, *FY**A/*FY**B e *FY**B/*FY**B.

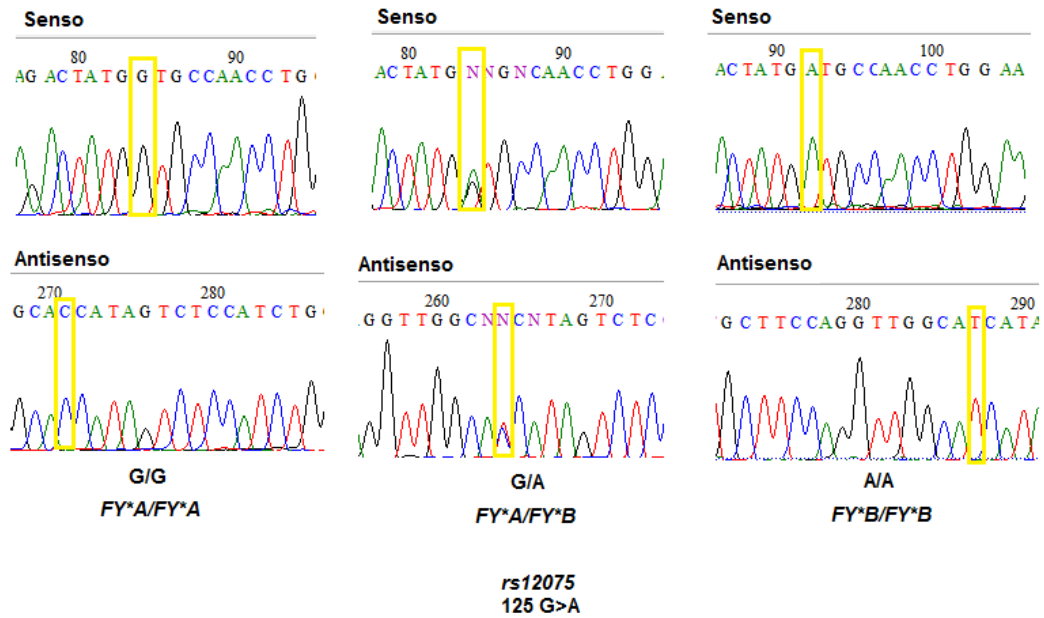


Figura 9: Eletroesferograma das regiões das mutações *rs34599082* (265C>T) e *rs13962* (298G>A) no exon 2, exemplificando a identificação dos alelos: *FY**B^{fraco}.

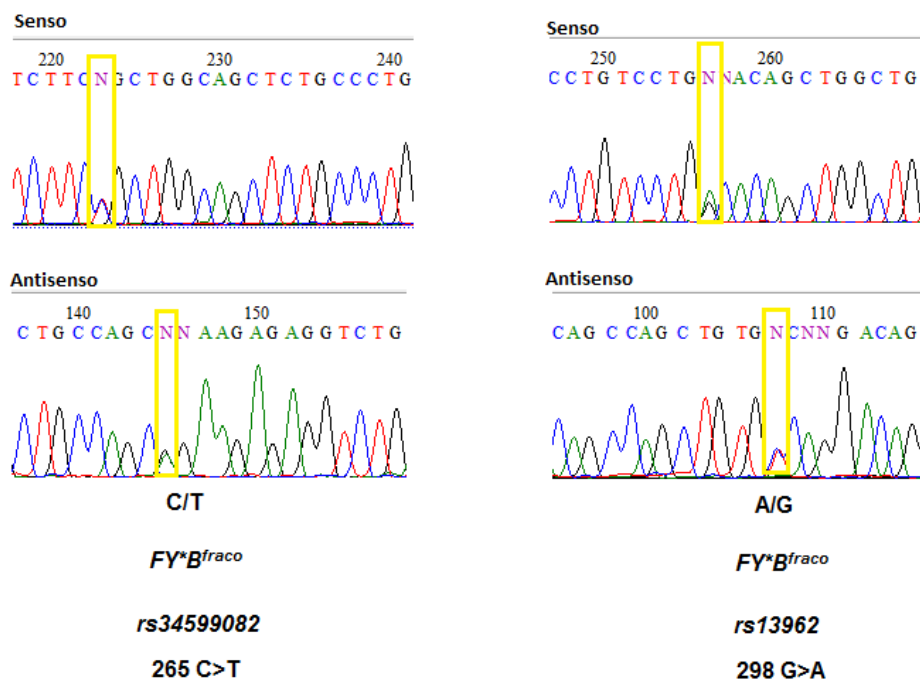
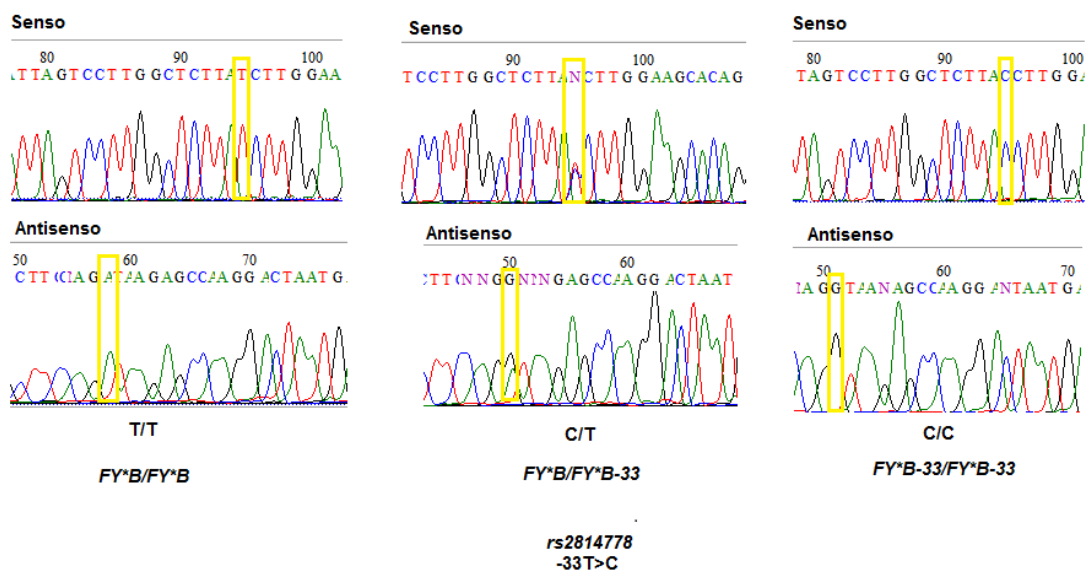


Figura 10: Eletroesferograma da região da mutação *rs2814778* (-33T>C) na região promotora GATA, exemplificando a identificação dos alelos *FY*B-33*.



4. 4 Análise estatística

Para a análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, levando-se em conta a variabilidade e a natureza das distribuições das variáveis estudadas. Foram aplicados os seguintes testes:

- Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes;
- Teste exato de Fisher, na presença das restrições de Cochran.

Para todos os testes estatísticos foi utilizado o nível de significância de 5% ($\alpha=5\%$), sendo estatisticamente significantes os testes com nível descritivo (p) menor que 0,05.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se InStat-2 software (Graphpad®, San Diego, CA, USA).

4. 5 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado em 22/05/2009 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo como projeto de tese de mestrado (CEP 0704/09), e encontra-se no Anexo A.

Foram obtidos termos de consentimento livre e esclarecido de todos os participantes (Anexo B).

5 Resultados

Nesse trabalho foram analisados 90 pacientes portadores de anemia falciforme sendo que 60% (54) eram do gênero feminino e 40% (36) eram do gênero masculino, com mediana de idade de 28 anos (variando de 18 a 68 anos) e média de $30,04 \pm 10,15$ anos. O uso de hidroxiuréia foi indicado em 47,7% pacientes.

As características dos fenótipos, genótipos, exames laboratoriais, manifestações clínicas, e exames de imagens de todos os pacientes envolvidos no estudo encontram-se resumidamente descritas nas tabelas 1, 2 e 3 no Apêndice C.

5.1 Fenotipagem e Genotipagem

A frequência alélica em nosso estudo evidenciou maior presença do alelo *FY*B*. Dentre as mutações observadas no alelo *FY*B*, a mais freqüente foi a *FY*B-33* (*rs2814778* -33T>C) e a mutação *rs34599082* (265C>T) foi encontrada somente em associação com a mutação *rs13962* (298G>A). (Tabela 3)

Tabela 3: Frequência alélica do gene *DUFFY* polimorfismo *rs12075* (125G>A) e frequência das mutações *rs2814778* (-33T>C), *rs34599082* (265C>T) e *rs13962* (298G>A) nos pacientes com AF.

Alelo	N	Frequência alélica
<i>FY*A</i>	52	0,29
<i>FY*B</i>	128	0,71
TOTAL	180	1,00

Alelo <i>FY*B</i>	N	Frequência alélica
<i>FY*B</i>	40	0,22
<i>FY*B-33</i>	77	0,43
<i>FY*B*</i>	9	0,05
<i>FY*B[#] + FY*B*</i>	2	0,01
TOTAL	128	1,00

Legenda:

*FY*B**: mutação *rs13962*, 298 G>A

*FY*B[#]*: mutação *rs34599082*, 265 C>T

Através da fenotipagem eritrocitária, foi identificado que 19 (21,1%) apresentavam fenótipo Fy(a+b-), 28 (31,1%) com Fy(a+b+), 19 (21,1%) com

Fy(a-b+) e 24 (26,7%) com Fy(a-b-). Quanto à genotipagem do *DUFFY*, os resultados obtidos para cada fenótipo são apresentados nas tabelas 4 a 7.

Para o fenótipo Fy(a+b-), foram encontrados 5 (26,3%) indivíduos com homozigose para *FY*A* e, como esperado, não foi encontrada nenhuma das mutações do gene *FY*B*. Os outros 14 indivíduos (73,7%) apresentaram genótipo *FY*A/FY*B*, sendo que 12 possuíam o alelo mutante *FY*B-33*, justificando a ausência de expressão do *FY*B*. Os dois pacientes que apresentaram o alelo selvagem (T) nesta posição, eram também portadores da mutação 298G>A. (Tabela 4)

Tabela 4: Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a+b-).

Fy(a+b-)	<i>rs12075</i>	<i>rs2814778</i>	<i>rs34599082</i>	<i>rs13962</i>
	125G>A	-33T>C	265C>T	298G>A
	<i>FY*A/FY*A</i> (5)	T/T (5)	C/C (5)	G/G (5)
	<i>FY*A/FY*B</i> (14)	T/T (2)* C/T (12)	C/C (14)	G/G (12) G/A (2)*
Total:	19			

* = *mesmos indivíduos*

Todos os indivíduos com o fenótipo Fy(a+b+) apresentaram genótipo *FY*A/FY*B*, entretanto, 8 (28,5%) apresentaram alelo mutante na posição *FY*B-33*, três (10,7%) alelo A na posição 298G>A sendo que um destes também apresentava alelo mutante na 265C>T. (Tabela 5)

Tabela 5: Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a+b+).

Fy(a+b+)	rs12075	rs2814778	rs34599082	rs13962
	125G>A	-33T>C	265C>T	298G>A
	<i>FY*A/FY*B</i>	T/T (20)	C/C (27)	G/G (25)
	(28)	T/C (8)	C/T (1)*	G/A (3) *
Total:	28			

* = mesmo indivíduo

Nos pacientes com fenótipo Fy(a-b+) foi encontrada a presença da mutação *FY*B-33* em 12 (63,1%) indivíduos, sendo em três na forma homozigota. Cinco indivíduos apresentaram apenas um alelo A na posição 298G>A, e nenhum indivíduo era portador do alelo T na posição 265C>T. (Tabela 6)

Tabela 6: Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a-b+).

Fy(a-b+)	rs12075	rs2814778	rs34599082	rs13962
	125G>A	-33T>C	265C>T	298G>A
	<i>FY*B/FY*B</i>	C/C (3)	C/C (19)	G/G (14)
	(19)	C/T (9)	C/T (0)	G/A (5)
		T/T (7)		
Total:	19			

Os pacientes fenotipados como Fy(a-b-) apresentaram pelo menos um alelo mutante na posição *FY*B-33*. Um indivíduo heterozigoto na posição *FY*B-33* também apresentou alelos mutantes nas posições 265C>T e 298G>A. (Tabela 7)

Tabela 7: Resultado da genotipagem dos indivíduos portadores do fenótipo Fy(a+b+).

Fy(a-b-)	rs12075	rs2814778	rs34599082	rs13962
	125G>A	-33T>C	265C>T	298G>A
	<i>FY*B/FY*B</i>	C/C (18)	C/C (23)	G/G (23)
	(24)	C/T (6)*	C/T (1)*	G/A (1)*
		T/T (0)		
Total:	24			

* = mesmo indivíduo

5.2 Manifestações laboratoriais e clínicas:

Considerando-se que a maior parte dos fenótipos (88,9%) pode ser explicada pela análise genotípica, na avaliação dos dados laboratoriais e clínicos, os pacientes foram divididos, de acordo com o fenótipo, em dois grupos: Duffy-Positivo – fenótipos Fy(a+b-), Fy(a+b+) ou Fy(a-b+) e Duffy-Negativo – fenótipo Fy(a-b-).

5.2.1 Análises laboratoriais:

Os indivíduos Duffy-Positivos apresentaram níveis séricos de Hb significativamente mais elevados do que os Duffy-Negativos. As dosagens de HbS e HbF e a contagem de reticulócitos não mostraram significância entre os dois grupos. A dosagem de DHL, por sua vez, apresentou diferença estatística entre os dois grupos, sendo maior nos pacientes Duffy-negativo. (Tabela 8)

Tabela 8: Distribuição das manifestações laboratoriais segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

	Duffy- Positivo		Duffy-Negativo		<i>p</i> (Mann Whitney)
	Média (DP)	Mediana (Min-Max)	Média (DP)	Mediana (Min-Max)	
Hb (g/dL)	9,01 (1,4)	8,85 (6,2-14,1)	8,32 (1,4)	8,1 (5,1-11,6)	0,039*
HbS (%)	87,58 (8,8)	89,50 (53,0-97,5)	86,70 (15,0)	91,75 (25,8-96,0)	0,561
HbF (%)	7,40 (5,98)	5,10 (0,6-27,1)	5,98 (4,3)	5,15 (0,6-18,1)	0,409
Ret (10¹²/L)	322,88 (221,9)	277,59 (13,6-914,1)	271,56 (123,4)	200,74 (30,0-517,5)	0,616
DHL (U/L)	506,42 (369,3)	405,00 (173,0-2238,0)	634,59 (365,6)	556,00 (192,0-1667,0)	0,045*

Legenda:

DP: Desvio Padrão

Min-Max: Mínima-Máxima

Hb: Hemoglobina

Ret: Reticulócitos

HbS: Hemoglobina S

HbF: Hemoglobina Fetal

DHL: Desidrogenase láctica

5.2.2 Análise de Imagem

Os dados referentes à identificação de aumento na PAP através de exame de imagem estão descritos na tabela 9. Foi observado que 41% dos pacientes apresentaram mensuração de PAP acima de 30mmHg. A maioria

dos indivíduos Duffy-Negativos (14 de 22, 63,6%) apresentava PAP elevada e este dado foi significativo em comparação com o grupo Duffy-Positivo ($p = 0,0118$). Quando analisamos a razão de chance do indivíduo Duffy-Negativo apresentar aumento de PAP esta foi de 3,792 (95%IC: 1,350 – 10,652). (Tabela 9 e Gráfico 1)

Tabela 9: Distribuição da manifestação de PAP segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

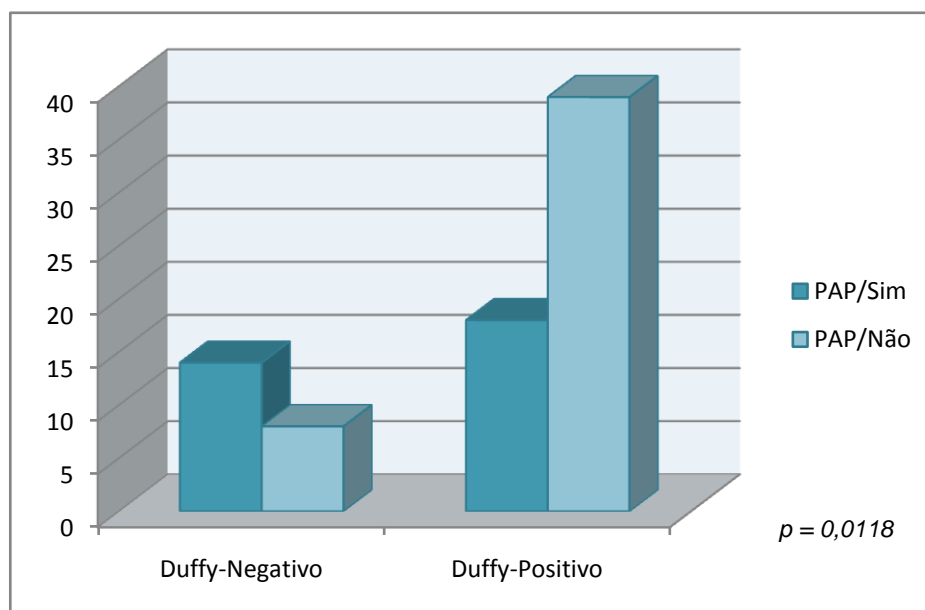
PAP	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	14 (18%)	8 (10%)	22 (28%)
Duffy-Positivo	18 (23%)	39 (49%)	57 (72%)
Total	32 (41%)	47 (59%)	79 (100%)

Teste de Fisher $p=0,0118$

Razão de Chances: 3,792

95% Intervalo de Confiança: 1,350 – 10,652

Gráfico 1: Análise da manifestação de PAP segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.



5.2.3 Análise das manifestações clínicas:

Os resultados das análises das manifestações clínicas estão relacionados nas tabelas 10 a 13.

A análise da manifestação de priapismo não mostrou diferença estatística. (Tabela 10). Resultado semelhante foi observado nas análises de ON (Tabela 11), STA (Tabela 12), e presença de UMI (Tabela 13). A análise referente ao AVE foi significativa e está descrita na Tabela 14 e Gráfico 2.

Tabela 10: Distribuição da manifestação de priapismo segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

Priapismo	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	5 (14%)	5(14%)	10 (28%)
Duffy-Positivo	7 (19%)	18(53%)	26 (72%)
Total	12 (33%)	24 (67%)	36 (100%)

Teste de Fisher $p=0,2474$

Tabela 11: Distribuição da manifestação de ON segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

ON	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	6 (7%)	17 (19%)	23 (26%)
Duffy-Positivo	21(24%)	44 (50%)	65 (74%)
Total	27 (31%)	61 (69%)	88 (100%)

Teste de Fisher $p=0,7930$

Tabela 12: Distribuição da manifestação de STA segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

STA	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	12 (14%)	11 (13%)	23 (26%)
Duffy-Positivo	22 (25%)	43 (49%)	65 (74%)
Total	34 (39%)	54 (61%)	88 (100%)

Teste de Fisher $p=0,1405$

Tabela 13: Distribuição da manifestação de UMI segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

UMI	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	10 (11%)	13 (15%)	23 (26%)
Duffy-Positivo	16 (18%)	49 (56%)	65 (74%)
Total	26 (30%)	62 (70%)	88 (100%)

Teste de Fisher $p=0,1126$

Na avaliação da presença de AVE, apenas os pacientes Duffy-Positivo apresentaram esta intercorrência, o que resultou em diferença estatística entre os grupos.

Tabela 14: Distribuição da manifestação de AVE segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

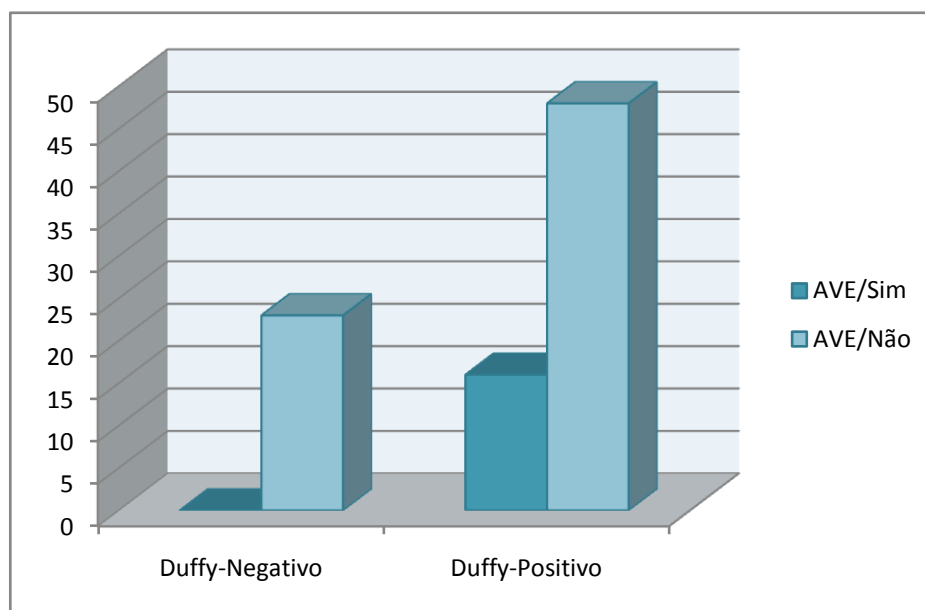
AVE	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	0 (0%)	23 (26%)	23 (26%)
Duffy-Positivo	16 (18%)	48 (55%)	64 (74%)
Total	(18%)	71 (82%)	87 (100%)

Teste de Fisher $p=0,0049$

Razão de Chances: 0,0625

95% Intervalo de Confiança: 0,0035-1,089

Gráfico 2: Análise da manifestação de AVE segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.



5.2.4 Análise do uso de hidroxiuréia:

Houve forte tendência à maior prescrição de HU nos indivíduos Duffy-Positivo ($p=0.0528$). Nesta análise observa-se que o fenótipo Duffy-Negativo teria um efeito protetor em relação às manifestações clínicas que indicam o uso de HU. (Razão de Chances: 0,3524; 95%IC: 0,1278 – 0,9717) (Tabela 15)

Tabela 15: Distribuição do uso de HU segundo fenótipo Duffy Negativo ou Positivo.

HU	Sim	Não	Total
Duffy- Negativo	7 (8%)	16 (18%)	23 (26%)
Duffy-Positivo	36 (41%)	29 (33%)	65 (74%)
Total	43 (49%)	45 (51%)	88 (100%)

Teste de Fisher $p=0,0528$

Razão de Chances: 0,3524

95% Intervalo de Confiança: 0,1278 – 0,9717

6 Discussão:

A distribuição do fenótipo Duffy varia de acordo com a origem étnica da população estudada. A AF, constituída por indivíduos Afro-descendentes em sua maioria, apresenta predomínio do fenótipo Fy(a-b-). (Tournamille, Colin et al. 1995)

A análise fenotípica observada neste trabalho foi semelhante à de estudos anteriores realizados no Brasil, em doadores de sangue (Castilho, Rios et al. 2004) e em portadores de AF (Novaretti, Bonifacio et al. 2007). Esta comparação reforça a idéia da importância da miscigenação na população brasileira, já que doadores e portadores de AF apresentam fenótipo semelhante. Quando comparamos nossos dados com os de população falcêmica da Antilha Holandesa, entretanto, observamos diferença estatística (Schnog, Keli et al. 2000), provavelmente pela pouca miscigenação deste último grupo. Estes dados estão apresentados na Tabela 16.

Apesar das semelhanças com outros estudo brasileiros, vale a pena ressaltar que no estudo realizado por Langhi Jr et al com doadores de sangue na cidade de São Paulo foi encontrada distribuição fenotípica peculiar. Tal fato pode ser resultado do maior tamanho amostral da análise de Langhi Jr et al. (Langhi Jr 2004)

Tabela 16: Distribuição fenotípica do Sistema Duffy em grupos populacionais de doadores de sangue brasileiros e em portadores de AF no Brasil e na Antilha Holandesa.

	Fy(a+b-) N (%)	Fy(a+b+) N (%)	Fy(a-b+) N (%)	Fy(a-b-) N (%)	X² P
Trabalho atual N=90	19 (21,1)	28 (31,1)	19 (21,1)	24 (26,7)	
Castilho et al ¹ N=361	93 (26,0)	89 (25,0)	102 (28,0)	77 (21,0)	0,253
Langhi Jr ² N=199	53 (27,0)	40 (20,0)	82 (41,0)	24 (12,0)	0,0003
Schnog et al ³ N=51	3 (6,0)	3 (6,0)	9 (17,0)	36 (71,0)	< 0,0001
Novaretti et al ⁴ N=91	22 (24,2)	16 (17,6)	32 (35,2)	21 (23,1)	0,072

Legenda

X²: comparação dos resultados do estudo atual com cada um dos grupos citados

1 e 2: Doadores de sangue

3 e 4: Portadores de Doença Falciforme

1 (Castilho, Rios et al. 2004)

2 (Langhi Jr 2004)

3 (Schnog, Keli et al. 2000)

4 (Novaretti, Bonifacio et al. 2007)

O fenótipo Fy(a-b-) em Afro-descendentes, tipicamente, é resultante da presença de mutação característica no alelo *FY*B*, *FY*B-33*. (Tournamille, Colin et al. 1995) Neste estudo, encontramos o predomínio do alelo *FY*B*, dado similar aos encontrados no estudo de Castilho et al, em sua análise genotípica de doadores de sangue do estado de São Paulo. (Castilho, Rios et al. 2004)

O fenótipo Fy(a+b-) foi encontrado em 26,3% dos pacientes estudados. Na análise genotípica deste grupo, foram observados dois diferentes genótipo: *FY*A/FY*A* e *FY*A/FY*B*. Neste último grupo, 12 possuíam a mutação -33T>C resultando no alelo *FY*B-33* enquanto os dois restantes com ausência de mutação -33T>C apresentaram a mutação 298G>A, responsável por baixa expressão do Fy^b. Esse resultado concorda com estudo de Olsson et al, que também observaram que a troca de bases 298G>A poderia enfraquecer a expressão desse antígeno.(Olsson, Smythe et al. 1998)

Como esperado, os pacientes com o fenótipo Fy(a+b+) apresentaram o genótipo *FY*A/FY*B*. Entretanto, 8 (28%) pacientes eram portadores da mutação *FY*B-33* e três (11%) apresentavam a mutação 298G>A, sendo que um deles também apresentava a mutação 265C>T. Infelizmente, não pudemos confirmar a genotipagem destes pacientes *FY*B-33* através do seqüenciamento, embora tanto a fenotipagem quanto a PCR-RFLP tenham sido repetidas e analisadas por diferentes observadores. O fato de indivíduos com as mutações 298G>A e 265C>T expressarem o fenótipo Fy^b pode estar relacionado à expressão gênica propriamente dita, já que estas mutações interferem nesta expressão podendo permitir a positividade do exame.

Todos os indivíduos Fy(a-b+) apresentaram genotipagem *FY*B/FY*B*, porém, do mesmo modo que o grupo anterior, em 3 indivíduos não houve concordância entre fenotipagem e genotipagem, pois eles apresentaram homozigose para o alelo *FY*B-33*. Do mesmo modo que no caso anterior, estes dados também não puderam ser confirmados por seqüenciamento. A mutação 298G>A foi observada em heterozigose em 5 indivíduos, o que pode explicar o fenótipo obtido.

Quanto à análise do fenótipo Fy(a-b-), a maioria (75%) dos indivíduos apresentaram genótipo *FY*B-33* homozigoto, entretanto seis (25%) tinham a mutação *FY*B-33* na forma heterozigota. Tal fato pode ser explicado pelo trabalho de Zimmerman et al, que postularam que, mesmo em heterozigose, pode haver diminuição na expressão deste antígeno nos eritrócitos. (Zimmerman, Woolley et al. 1999)

Não conseguimos confirmar a ocorrência simultânea das mutações -33T>C, 265C>T e 298G>A, descrita em trabalhos anteriores. (Castilho, Rios et al. 2004) Já a ocorrência conjunta das mutações 265C>T e 298G>A foi observada em dois indivíduos (2%), o que difere de relatos que mostram ausência dessas mutações em Afro-descendentes, embora sua freqüência em caucasianos varie de 2 a 5%. (Olsson, Smythe et al. 1998; Yazdanbakhsh, Rios et al. 2000)

A AF apresenta grande variabilidade clínica e diferentes pesquisadores procuram identificar fatores responsáveis por estas variações. A análise de outros genes, não relacionados à mutação da AF, pode ser capaz de identificar fatores modulares da gravidade destes pacientes. (Steinberg 2005)

Pelas características do Sistema Duffy, expostas anteriormente, e sua relação com a IL-8, poderíamos inferir que mutações neste gene interfeririam na atividade inflamatória destes indivíduos, levando a diferentes expressões clínicas.

Quando analisamos a Hb basal, observamos que os indivíduos Duffy-Negativo tinham Hb média de 8,32 g/dL enquanto que os Duffy-Positivo apresentaram Hb de 9,01 g/dL, e esta diferença foi significativa ($p=0,039$). Esses resultados diferem dos estudos de Afenyi-Annan et al e Nebor et al que não encontraram diferença nos níveis de Hb entre os grupos. As dosagens de HbS e HbF não mostraram diferença estatística. (Afenyi-Annan, Kail et al. 2008; Nebor, Durpes et al. 2010)

Nebor et al postularam que o grupo Duffy-Positivo tenderia a apresentar contagem de reticulócitos e dosagem de DHL mais elevadas que os pacientes Duffy-Negativo. Nossa casuística não mostrou diferença na contagem reticulocitária entre os grupos de pacientes, entretanto, a dosagem de DHL mostrou resultado oposto ao encontrado de Nebor et.al, com significativa elevação no pacientes Duffy-Negativo (634,59 U/L) em comparação aos Duffy-Positivo (506,42 U/L) ($p=0,045$). (Nebor, Durpes et al. 2010) Tal fato pode refletir uma ação secundária da HU, como será discutido mais à frente.

Na análise dos ecocardiogramas, os pacientes Duffy-Negativo apresentaram 3 vezes mais chances de elevação de PAP do que os Duffy-Positivo ($p=0,0118$), diferente do trabalho de Afenyi-Annan et al que não encontraram diferença entre os grupos ($p=0,180$). (Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

Quanto à manifestação de priapismo, análise preliminar realizada por nosso grupo mostrou que os indivíduos Duffy-Negativo apresentaram maior frequência desta manifestação ($p=0,02$). (Mecabo, Hayashida et al. 2010) Entretanto, com o aumento do número de casos estudados, não observamos mais a significância anteriormente detectada. Este resultado concorda com os achados de Nebor et al que também não observaram correlação entre Sistema Duffy e manifestação de priapismo.(Nebor, Durpes et al. 2010)

Quanto às manifestações de ON e UMI, não observamos diferença estatística entre os grupos, dados semelhantes aos de Nebor et al. (Nebor, Durpes et al. 2010) A STA também não mostrou resultado estatisticamente diferente entre os grupos, como nos estudos de Schnog et al e de Afenyi-Annan et al. (Schnog, Keli et al. 2000; Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

A manifestação de AVE foi encontrada apenas nos indivíduos Duffy-Positivo, com resultado significativo ($p=0,0049$). Entretanto, Afenyi-Annan et al não encontraram diferença na presença de AVE nos grupos por eles analisados ($p=0,452$). (Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

Curiosamente, o presente estudo mostrou que o uso de HU foi mais indicado no grupo de pacientes Duffy-Positivo, mostrando que estes indivíduos tem 2,8 vezes mais chance de estar utilizando HU sob prescrição médica. Os dados de Afenyi-Annan et al também mostraram associação entre uso de HU e fenótipo Duffy-positivo ($p=0,002$), entretanto nesse trabalho a indicação de HU é diferente daquela por nós utilizada, o que dificulta a comparação entre os estudos. (Afenyi-Annan, Kail et al. 2008)

De modo geral, não foram observadas diferenças laboratoriais entre os pacientes Duffy-Positivo e -Negativo e tal fato pode ser devido à maior utilização de HU no grupo Duffy-Positivo. Resultados que corroboram esta hipótese são a maior Hb sérica e o menor nível de DHL encontrados nos indivíduos Duffy-Positivo, sugerindo menor hemólise pela ação da HU. (Charache, Barton et al. 1996)

Diante os resultados apresentados, podemos inferir que a presença das mutações estudadas está fortemente associada à expressão do Sistema Duffy. Do ponto de vista dos dados clínico-laboratoriais associados ao Sistema Duffy, embora os indivíduos Duffy-Negativo apresentem maior frequência de PAP, seu índice de utilização de HU é menor e, portanto, não conseguimos afirmar que apresentam pior evolução clínica. Com isso, mais estudos, de preferência multicêntricos, são necessários para esclarecer esta questão.

7 Conclusões

A frequência fenotípica encontrada nos pacientes com AF estudados [fenótipo Fy(a+b-): 21,1%; Fy(a+b+): 31,1%; Fy(a-b+): 21,1%; Fy(a-b-): 26,7%] foi semelhante à observada em outros estudos Brasileiros.

Observou-se o predomínio do alelo *FY*B* (71%), sendo que destes 43% apresentaram a mutação *FY*B-33*.

Os achados fenotípicos e genotípicos foram concordantes em 88,9% dos casos.

As características laboratoriais significativas deste estudo mostraram que os pacientes do grupo Duffy-Negativo possuíam uma Hb basal menor ($p=0,039$) e dosagem de DHL mais elevada ($p=0,045$) que o grupo de indivíduos Duffy-Positivo. Entretanto, tal resultado pode ter sido influenciado pelo maior número de indivíduos em uso de HU no grupo Duffy-Positivo ($p=0,0528$; Razão de Chances: 0,3524; 95% Intervalo de Confiança: 0,1278-0,9717).

Quanto aos dados clínicos avaliados, observou-se maior presença de PAP nos pacientes Duffy-Negativo ($p=0,0118$; Razão de Chances: 3,792; 95% Intervalo de Confiança: 1,350- 10,652), enquanto a manifestação de AVE foi encontrada somente nos pacientes Duffy-Positivo ($p=0,0049$; Razão de Chances: 0,0625; 95% Intervalo de Confiança: 0,0035-1,089).

8 Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2003). Imunologia Celular e Molecular.
- Afenyi-Annan, A., M. Kail, et al. (2008). "Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease." Transfusion **48**(5): 917-24.
- Albrey, J. A., E. E. Vincent, et al. (1971). "A new antibody, anti-Fy3, in the Duffy blood group system." Vox Sang **20**(1): 29-35.
- Angulo, I. L. (2007). "Acidente vascular cerebral e outras complicações do Sistema Nervoso Central nas doenças falciformes." Rev Bras Hemat Hemot **29**: 262-7.
- ANVISA, A. N. d. V. S., Ministério da Saúde. (2002). Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília (DF), Anvisa.
- Barnwell, J. W., M. E. Nichols, et al. (1989). "In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by Plasmodium vivax." J Exp Med **169**(5): 1795-802.
- Behzad, O., C. Lee, et al. (1973). "A new anti-erythrocyte antibody in the Duffy system: anti-Fy4." Vox Sang **24**: 337-342.
- Braga, J. (2007). "Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes." Rev Bras Hemat Hemot **29**: 233-8.
- Bunn, H. F. (1997). "Pathogenesis and treatment of sickle cell disease." N Engl J Med **337**(11): 762-9.
- Cançado, R. D., C. Lobo, et al. (2009). "Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxíureia na doença falciforme." Rev Bras Hemat Hemot **31**: 361-366.
- Carvalho, A. C. C., D. R. Almeida, et al. (2005). "Diagnóstico da Hipertensão Pulmonar.", from <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2005/039.asp>.
- Castilho, L. (2007). "The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system." Transfusion **47**(1 Suppl): 28S-31S.
- Castilho, L., M. Rios, et al. (2004). "A novel FY allele in Brazilians." Vox Sang **87**(3): 190-5.
- Charache, S., F. B. Barton, et al. (1996). "Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia." Medicine (Baltimore) **75**(6): 300-26.
- Chaudhuri, A., J. Polyakova, et al. (1995). "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 **85**(3): 615-21.
- Chaudhuri, A., J. Polyakova, et al. (1993). "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." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10793-7.
- Chown, B., M. Lewis, et al. (1965). "The Duffy Blood Group System in Caucasians: Evidence for a New Allele." Am J Hum Genet **17**: 384-9.
- Colledge, K., M. Pazzulich, et al. (1973). "Anti-Fy5, an antibody disclosing a probable association between the Rhesus and Dyffy blood group genes." Vox Sang **24**: 1993-1999.

- Costa, F. F. (2004). Anemia Falciforme. Hematologia- Fundamentos e Prática. Atheneu. São Paulo, Zago, M.A.
- Falcão, R.P.
- Pasquini, R. . **1**: 289-307.
- Costa, P. J. M. S., R. Q. B. Vilela, et al. (2006). "Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme. ." Rev Bras Hematol Hemoter. **28**: 40-44.
- Cutbush, M. and P. L. Mollison (1950). "The Duffy blood group system." Heredity **4**: 383-89.
- Cutbush, M., P. L. Mollison, et al. (1950). "A new human blood group." Nature: 165-88.
- Daniels, G., J. Poole, et al. (2002). "The clinical significance of blood group antibodies." Transfus Med **12**(5): 287-95.
- Daniels, G. L., A. Fletcher, et al. (2004). "Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens." Vox Sang **87**(4): 304-16.
- Darbonne, W. C., G. C. Rice, et al. (1991). "Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin." J Clin Invest **88**(4): 1362-9.
- de Brevern, A. G., H. Wong, et al. (2005). "A structural model of a seven-transmembrane helix receptor: the Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC)." Biochim Biophys Acta **1724**(3): 288-306.
- Dohlman, H. G., J. Thorner, et al. (1991). "Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors." Annu Rev Biochem **60**: 653-88.
- Ebong, W. W. (1980). "The treatment of severely ill patients with sickle cell anemia and associated septic arthritis." Clin Orthop Relat Res(149): 145-59.
- Figueiredo, M. S. (2007). "Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal." Rev Bras Hemat Hemot **29**: 313-315.
- Figueiredo, M. S., J. Kerbauy, et al. (1996). "Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil." Am J Hematol **53**(2): 72-6.
- Flint, J., R. M. Harding, et al. (1998). "The population genetics of the haemoglobinopathies." Baillieres Clin Haematol **11**(1): 1-51.
- Habibi, B., P. Perrier, et al. (1980). "HD50 assay evaluation of the antigen Fy3 depression in Fyx individuals." J Immunogenet **7**(2): 191-3.
- Herrick, J. B. (1910). " Peculiar elongated and sickled-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia." Arch Intern Med **6**: 517-521.
- Horuk, R., C. E. Chitnis, et al. (1993). "A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor." Science **261**(5125): 1182-4.
- Horuk, R., T. J. Colby, et al. (1993). "The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor." Biochemistry **32**(22): 5733-8.
- Ikin, E. W., A. E. Mouran, et al. (1951). "Discovery of the excepted haemagglutinin anti-Fyb." Nature **168**: 1.077.
- Issit, P. D. and D. J. Anstee (1998). Applied blood group serology.

- Iwamoto, S., J. Li, et al. (1996). "Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium." Blood **87**(1): 378-85.
- Iwamoto, S., T. Omi, et al. (1995). "Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue." Blood **85**(3): 622-6.
- Jeans, R. B. P., A. S. Ramalho, et al. (1993). "Anemia Falciforme como problema de saúde pública." Revista de Saúde Pública **27**: 54-58.
- Kato, G. J., M. T. Gladwin, et al. (2007). "Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes." Blood Rev **21**(1): 37-47.
- Keoghane, S. R., M. E. Sullivan, et al. (2002). "The aetiology, pathogenesis and management of priapism." BJU Int **90**(2): 149-54.
- King, C. L., P. Michon, et al. (2008). "Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8363-8.
- Lanaro, C., C. F. Franco-Penteado, et al. (2009). "Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy." J Leukoc Biol **85**(2): 235-42.
- Landsteiner, K. (1931). "Individual Differences in Human Blood." Science **73**(1894): 403-9.
- Langhi, D. M., Jr. and J. O. Bordin (2006). "Duffy blood group and malaria." Hematology **11**(5): 389-98.
- Langhi Jr, D. M. (2004). Estudo do sistema de grupo sanguíneo Duffy em habitantes de região endêmica para malária e doadores de sangue. Disciplina de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo.
- Langhi Jr, D. M., S. Albuquerque, et al. (2004). "Presença do alelo FYAnull, do sistema de grupo sanguíneo Duffy em habitantes de região endêmica para malária em doadores de sangue no Brasil." Rev Bras Hemat Hemot **26**: 268-9.
- Lee, T. H., N. S. Sakahara, et al. (1998). "Quantitation of white cell subpopulations by polymerase chain reaction using frozen whole-blood samples. Viral Activation Transfusion Study." Transfusion **38**(3): 262-70.
- Marengo-Rowe, A. J. (1965). "Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate." J Clin Pathol **18**(6): 790-2.
- McLaughlin VV, Archer SL, et al. (2009). "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association." J Am Coll Cardiol. **53**(17): 1573-619.
- Mecabo, G., D. Y. Hayashida, et al. (2010). "Duffy-negative is associated with hemolytic phenotype of sickle cell anemia." Clin Immunol **136**(3): 458-9; author reply 460-1.
- Meny, G. M. (2010). "The Duffy blood group system: a review." Immunohematology **26**(2): 51-6.

- Miller, L. H., S. J. Mason, et al. (1975). "Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants." Science **189**(4202): 561-3.
- Minniti, C. P., J. Eckman, et al. (2010). "Leg ulcers in sickle cell disease." Am J Hematol **85**(10): 831-3.
- Moore, S., C. F. Woodrow, et al. (1982). "Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rh(D), (c), (E) and Fy." Nature **295**(5849): 529-31.
- Moreira Junior, G., J. O. Bordin, et al. (1996). "Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: the influence of racial and antigenic pattern differences between donors and recipients in Brazil." Am J Hematol **52**(3): 197-200.
- Morris, C. R. (2008). "Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 177-85.
- Mourant, A. E., A. C. Kopec, et al. (1976). The distribution of the human blood groups, and other polymorphisms. London, Oxford University Press.
- Nebor, D., M. C. Durpes, et al. (2010). "Association between Duffy antigen receptor for chemokines expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients." Clin Immunol **136**(1): 116-22.
- Neote, K., J. Y. Mak, et al. (1994). "Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor." Blood **84**(1): 44-52.
- Nichols, M. E., P. Rubinstein, et al. (1987). "A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to Plasmodium vivax." J Exp Med **166**(3): 776-85.
- Novaretti, M. C. Z., S. L. Bonifacio, et al. (2007). "Rapid Dufft genotyping in sickle cell disease patients using PCR-SSP is a valuable tool for blood component selection." Blood **110**:S2091.
- Novaretti, M. C. Z., P. E. Dorlhiac-Llacer, et al. (2000). "Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides da cidade de São Paulo." Rev Bras Hemat Hemot: 23-32.
- Ohene-Frempong, K., S. J. Weiner, et al. (1998). "Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors." Blood **91**(1): 288-94.
- Okpala, I. E. (2005). "New therapies for sickle cell disease." Hematol Oncol Clin North Am **19**(5): 975-87, ix.
- Olsson, M. L., J. S. Smythe, et al. (1998). "The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein." Br J Haematol **103**(4): 1184-91.
- Pathare, A., S. A. Kindi, et al. (2003). "Cytokines in sickle cell disease." Hematology **8**(5): 329-37.
- Pembrey, M. E., P. McWade, et al. (1972). "Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation." J Clin Pathol **25**(8): 738-40.
- Philippsen, A. (2002). "DINO: Visualizing Structural Biology." Retrieved 02032011, from <http://www.dino3d.org>
- Platt, O. S., D. J. Brambilla, et al. (1994). "Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death." N Engl J Med **330**(23): 1639-44.

- Pogo, A. O. and A. Chaudhuri (2000). "The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor." Semin Hematol **37**(2): 122-9.
- Pryor, J., E. Akkus, et al. (2004). "Priapism." J Sex Med **1**(1): 116-20.
- Quirolo, K. (2010). "How do I transfuse patients with sickle cell disease?" Transfusion **50**(9): 1881-6.
- Rees, D. C., T. N. Williams, et al. (2010). "Sickle-cell disease." Lancet.
- Rios, M., A. Chaudhuri, et al. (2000). "New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B." Br J Haematol **108**(2): 448-54.
- Rogers, Z. R. (2005). "Priapism in sickle cell disease." Hematol Oncol Clin North Am **19**(5): 917-28, viii.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sanger, R., R. RR;, et al. (1955). "The Duffy blood groups of New Yor negroes: the phenotype Fy (a-b-). ." Br J Haematol **1**: 370-4.
- Schnog, J. B., S. O. Keli, et al. (2000). "Duffy phenotype does not influence the clinical severity of sickle cell disease." Clin Immunol **96**(3): 264-8.
- Serjeant, G. R. (1997). "Sickle-cell disease." Lancet **350**(9079): 725-30.
- Steinberg, M. H. (2005). "Predicting clinical severity in sickle cell anaemia." Br J Haematol **129**(4): 465-81.
- Steinberg, M. H. and G. P. Rodgers (2001). "Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers." Semin Hematol **38**(4): 299-306.
- Stuart, M. J. and R. L. Nagel (2004). "Sickle-cell disease." Lancet **364**(9442): 1343-60.
- Szymanski, I. O., S. R. Huff, et al. (1982). "An autoanalyzer test to determine immunoglobulin class and IgG subclass of blood group antibodies." Transfusion **22**(2): 90-5.
- Toivanen, P. and T. Hirvonen (1973). "Antigens Duffy, Kell, Kidd, Lutheran and Xg a on fetal red cells." Vox Sang **24**(4): 372-6.
- Tournamille, C. (2000). "[Molecular basis and structure-activity relationships of the Duffy blood group antigens: chemokine and Plasmodium vivax receptors]." Transfus Clin Biol **7**(5): 497-509.
- Tournamille, C., Y. Colin, et al. (1995). "Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals." Nat Genet **10**(2): 224-8.
- Tournamille, C., C. Le Van Kim, et al. (1995). "Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism." Hum Genet **95**(4): 407-10.
- Tournamille, C., C. Le Van Kim, et al. (1998). "Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals." Blood **92**(6): 2147-56.
- Van der Laken, C. J., O. C. Boerman, et al. (1998). "The kinetics of radiolabelled interleukin-8 in infection and sterile inflammation." Nucl Med Commun **19**(3): 271-81.
- Vicari, P. (2007). Contribuição dos polimorfismos das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 na hipertensão pulmonar da anemia falciforme.

- Disciplina de Hematologia e Hemoterapia. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo.
- Vicari, P. and M. S. Figueiredo (2007). "Priapismo na doença falciforme." Rev Bras Hemat Hemot **29**.
- Vichinsky, E., D. Hurst, et al. (1988). "Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality." Pediatrics **81**(6): 749-55.
- Walz, W., T. Calandra, et al. (2003). "Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook." Humana Press **11**: 248-9.
- Yazdanbakhsh, K., M. Rios, et al. (2000). "Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens." Transfusion **40**(3): 310-20.
- Zago, M. A. and A. C. S. Pinto (2007). "Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos." Rev Bras Hematol Hemoter **29**: 207-214.
- Zimmerman, P. A., I. Woolley, et al. (1999). "Emergence of FY*A(null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13973-7.

APÊNDICE A

Questionário aplicado nos pacientes homens referente à manifestação de priapismo:



Ambulatório de Anemias Hereditárias

Disciplina de Hematologia e Hemoterapia UNIFESP/EPM

Nome: _____ Idade: _____

Diagnóstico: _____ HbFetal: _____ Hb basal _____

Hidroxiuréia (); Ácido Fólico (); Dietilbestrol (); outros: _____

Episódio de Priapismo Agudo: () sim () não Freqüência: _____

Idade do primeiro episódio: _____

Tratamentos: _____

Stuttering (priapismo freqüente: () sim () não Freqüência: _____

Idade do primeiro episódio: _____

Tratamentos: _____

Disfunção sexual: () sim () não

Prótese peniana: () sim () não

Observações: _____

APÊNDICE B

EXTRAÇÃO DNA

Lee, T. H., N. S. Sakahara, et al. (1998). "Quantitation of white cell subpopulations by polymerase chain reaction using frozen whole-blood samples. Viral Activation Transfusion Study." *Transfusion* **38**(3): 262-70.

Soluções usadas:

"Solução A"

KCl (PM: 74,56)	100 mM	0,7455 g	ajustar pH 8,3 com HCl
Tris (PM: 121,14)	10 mM	0,1211 g	
MgCl ₂ anidro (PM: 95,21)	2,5 mM	0,0238 g	
H ₂ O	qsp	100 mL	

Autoclavar

"Solução A com Saponina"

1 ml/amostra

Igual à solução A acrescentando saponina após autoclavar

Saponina*	0,02%	0,02 g/100mL H ₂ O
-----------	-------	-------------------------------

* Depende do n^o de amostras a serem extraídas

Ex.: em 10 amostras acrescentar 0,002 g em 10 mL de solução A

"Solução B"

Tris (PM: 121,14)	10 mM	0,1211 g	ajustar pH 8,3 com HCl
MgCl ₂ anidro (PM: 95,21)	2,5 mM	0,0238 g	
Tween	1%	1 ml	
Triton X 100	1%	1 ml	
H ₂ O	qsp	100 mL	

Autoclavar

Acrescentar na hora do uso Proteinase K 0,4 mg/mL

Fase1: Lise de hemácias e lavagem dos leucócitos

- 1) Pipetar 2,0 mL de sangue total em um eppendorf de 2 mL
- 2) Centrifugar a 6000 rpm (1800g) durante 5 minutos
- 3) Desprezar o sobrenadante (hemolisado)
- 4) Adicionar 1,0 mL de Solução A com saponina
- 5) Ressuspender o pellet, homogeneizando
- 6) Centrifugar a 6000 rpm durante 5 minutos
- 7) Repetir os itens 3, 4 e 5
- 8) Desprezar o sobrenadante
- 9) Adicionar 1,0 mL de Solução A sem saponina
- 10) Ressuspender o pellet, centrifugar e desprezar o sobrenadante
- 11) Nesta fase o pellet de leucócitos pode ser congelado a -20°C , ou segue-se para a fase de extração.

Fase 2: Extração do DNA

- 1) Preparar a solução de extração:
Solução A + Solução B com proteinase K (proporção 1:1)
- 2) Para 2 mL de sangue inicial, adicionar 400 μL desta solução
- 3) Agitar no vórtex e incubar a 60°C durante 1 hora, agitando a cada 20 minutos aproximadamente.

Fase 3: Purificação de DNA por fenol-clorofórmio

- 1) Em cada tubo contendo 400 μL de incubado, adicionar o mesmo volume de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1)
- 2) Agitar no vórtex por 10 segundos e centrifugar a 14000 rpm, durante 5 minutos
- 3) Transferir o sobrenadante para outro eppendorf já identificado
- 4) Repetir os itens anteriores.
- 5) Preparar nova solução com clorofórmio + álcool Isoamílico (24:1) e adicionar 400 μL desta solução em cada eppendorf
- 6) Agitar no vórtex, centrifugar e separar o sobrenadante
- 7) Adicionar 1/10 do volume (40 μL) de acetato de sódio 3M e 1 mL de Etanol puro gelado (2 x o volume)
- 8) Homogeneizar rapidamente e observar a precipitação do DNA
- 9) Centrifugar a 14000 rpm (17000g) durante 15 minutos e desprezar o etanol
- 10) Lavar o DNA com etanol 70% (adicionar 1 mL de etanol 70% e centrifugar)
- 11) Desprezar o sobrenadante e deixar secar à temperatura ambiente
- 12) Ressuspender o pellet em 100 μL de água destilada estéril
- 13) Congelar a -70°C .

APÊNDICE C

Tabela 1: Características dos fenótipos e genótipos dos 90 pacientes avaliados no trabalho:

Nºs	Nome	Gênero	Idade	Fenótipo	<i>rs2814778</i> -33 T>C	<i>rs12075</i> 125 G>A	<i>rs34599082</i> 265 C>T	<i>rs13962</i> 298 G>A
1	BGF	M	50	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
2	EASS	F	20	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
3	ARC	M	24	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
4	CMD	F	26	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
6	CSF	M	24	(a+b+)	T/T	A/B	C/T	G/A
7	ABA	M	26	(a+b-)	T/T	A/B	C/C	G/A
8	EESC	F	28	(a+b-)	T/T	A/B	C/C	G/A
9	EARB	F	29	(a-b+)	C/C	B/B	C/C	G/G
10	ASNL	F	31	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
12	AAS	F	28	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/A
13	ISS	F	35	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/A
14	ASF	M	25	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
15	ALSS	M	39	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
16	CGC	F	30	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
17	SDS	F	25	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
18	SRO	F	47	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
19	SMS	F	27	(a-b-)	C/T	B/B	C/C	G/G
20	VSB	F	31	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
22	JGM	M	38	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
23	IBS	F	52	(a+b-)	T/T	A/A	C/C	G/G
24	JASM	M	38	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
25	VSB	F	30	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
26	RAM	M	25	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
27	SAS	F	25	(a-b-)	C/T	B/B	C/C	G/G

N ^o s	Nome	Gênero	Idade	Fenótipo	<i>rs2814778</i> -33 T>C	<i>rs12075</i> 125 G>A	<i>rs34599082</i> 265 C>T	<i>rs13962</i> 298 G>A
28	VAM	F	29	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
30	CBC	F	19	(a+b-)	T/T	A/A	C/C	G/G
31	HJP	M	32	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
32	PAA	M	26	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
33	FCS	M	33	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
34	EASM	F	35	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
35	RGS	M	26	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
36	GXS	F	31	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/A
37	MRF	F	35	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
38	ABNV	F	28	(a-b-)	C/T	B/B	C/C	G/G
39	CSD	M	21	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
40	MCB	F	31	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
42	PSC	M	40	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
43	NJSF	F	46	(a-b+)	C/C	B/B	C/C	G/G
45	HCOL	F	22	(a-b+)	C/C	B/B	C/C	G/G
46	ZBS	M	36	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/A
47	JGC	M	24	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
48	WJL	M	27	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
49	CCS	F	26	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
50	CBCS	F	40	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
51	MCS	F	30	(a-b-)	C/T	B/B	C/C	G/G
52	MDSC	F	28	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
54	DBS	F	20	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
55	NXS	F	20	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
56	DNS	M	24	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/A
57	MAS	F	50	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
58	RJS	M	34	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G

Nºs	Nome	Gênero	Idade	Fenótipo	<i>rs2814778</i> -33 T>C	<i>rs12075</i> 125 G>A	<i>rs34599082</i> 265 C>T	<i>rs13962</i> 298 G>A
59	RJS	F	24	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/A
60	DASS	F	29	(a+b-)	T/T	A/A	C/C	G/G
61	DJL	F	21	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
62	JSS	M	21	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
63	FRSR	F	31	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
64	NJS	F	24	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
65	CTC	F	62	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
66	MIS	F	68	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
67	GLO	M	25	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
68	CMC	F	57	(a-b-)	C/T	B/B	C/T	G/A
69	ABN	F	20	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
70	WPA	F	19	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
71	ABB	M	28	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/A
72	MMS	M	24	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
73	MMRS	F	18	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
74	JAG	M	30	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
75	DAS	F	31	(a+b-)	T/T	A/A	C/C	G/G
76	MS	M	33	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
78	IMS	F	46	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/G
79	JIS	M	23	(a+b-)	C/T	A/B	C/C	G/G
80	DAS	M	19	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
81	TRAR	M	23	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
83	FMS	M	38	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
84	DCS	F	24	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
85	RSS	F	55	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
86	RCS	F	28	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/A
87	MMS	M	33	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G

N ^o s	Nome	Gênero	Idade	Fenótipo	rs2814778 -33 T>C	rs12075 125 G>A	rs34599082 265 C>T	rs13962 298 G>A
88	FB	F	29	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
89	AFV	F	18	(a-b-)	C/T	B/B	C/C	G/G
90	RSR	M	22	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
91	LOS	F	23	(a-b+)	T/T	B/B	C/C	G/G
93	KML	F	20	(a+b+)	T/T	A/B	C/C	G/G
94	LRB	M	20	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
97	LSC	F	29	(a+b+)	C/T	A/B	C/C	G/G
98	WRC	M	30	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
99	DPJ	M	26	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G
100	WBO	M	19	(a-b-)	C/C	B/B	C/C	G/G
104	LSS	F	19	(a+b-)	T/T	A/A	C/C	G/G
106	NCN	F	34	(a-b+)	C/T	B/B	C/C	G/G

N^os: número das amostras

M: Masculino

F: Feminino

Tabela 2: Características laboratoriais dos 90 pacientes avaliados no trabalho:

Nºs	Nome	Hb	HbS	HbF	Ret	DHL
1	BGF	11,6	90,2	8,4	223.56	192
2	EASS	7,3	93,3	3,6	305.73	423
3	ARC	8,4	86,9	10,4	X	1930
4	CMD	9,1	73,2	24	236.6	254
6	CSF	9,4	88,5	7,1	255.99	455
7	ABA	9,8	93,6	3,6	834.4	287
8	EESC	8,6	93,1	4,6	108.9	251
9	EARB	7,7	94,2	2,2	430.2	649
10	ASNL	8,2	86,2	11,7	422.22	383
12	AAS	11,2	94,6	2,8	379.22	485
13	ISS	8,6	93,8	2,5	311,19	723
14	ASF	9,8	81,1	15,7	426.62	387
15	ALSS	8,6	89,5	5,2	212.08	292
16	CGC	6,2	92,6	3,3	167.28	188
17	SDS	8,4	79,8	18,1	488.13	335
18	SRO	8,3	89,5	7,5	229.45	372
19	SMS	6,8	81,4	15,6	257.47	792
20	VSB	7,1	94,1	3	303.6	552
22	JGM	7	93,9	2,4	120.2	2238
23	IBS	9,6	83,5	13,4	40.68	281
24	JASM	8,4	93,2	4,8	80.91	672
25	VSB	7,5	92	4	353.08	676
26	RAM	9,6	78,5	19,3	174.57	546
27	SAS	8	89,8	7,6	89.87	617
28	VAM	11	89,5	8,7	120.05	318
30	CBC	8,4	90,7	4,9	X	255