

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

**CAROLINE SANUZI QUIRINO DE MEDEIROS**

**ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES NA ANEMIA FALCIFORME:  
ETIOPATOGENIA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA ASSOCIADA À  
PATOGENICIDADE E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E  
CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMO DO GENE *MBL2***

Recife

2015

**CAROLINE SANUZI QUIRINO DE MEDEIROS**

**ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES NA ANEMIA FALCIFORME:  
ETIOPATOGENIA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA ASSOCIADA À  
PATOGENICIDADE E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E  
CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMO DO GENE *MBL2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, área de Concentração em Micologia aplicada, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia de Fungos.

Orientador: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

RECIFE

2015

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Medeiros, Caroline Sanuzi Quirino**

**Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme: etiopatogenia, análise microbiológica associada à patogenicidade e susceptibilidade antifúngica e correlação com polimorfismo do gene MBL2 / Recife: O Autor, 2015.**

**129 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Rejane Pereira Neves**

**Coorientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2015.**

**Inclui referências, apêndice e anexo**

- 1. Anemia falciforme 2. Fungos 3. Infecção I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (coorient.) III. Título**

**616.1527**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017- 453**

**CAROLINE SANUZI QUIRINO DE MEDEIROS**

**ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES NA ANEMIA FALCIFORME:  
ETIOPATOGENIA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA ASSOCIADA À  
PATOGENICIDADE E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA E  
CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMO DO GENE *MBL2***

Aprovada em: 29/07/2015

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Rejane Pereira Neves  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura  
Universidade de Pernambuco

---

Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macedo  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Ana Maria Rabelo de Carvalho  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2015

## ***DEDICO***

Aos meus pais e irmãos;  
pelo apoio, incentivo e carinho.

Ao meu esposo Odnilson;  
companheiro de todas as horas e de toda essa jornada. Sem seu amor e apoio  
seria impossível. Com você vivo meus melhores momentos.

Ao meu filho Mateus;  
pelo simples presente de ser sua mãe e por dar novo significado a tudo

## AGRADECIMENTOS

Concluir este trabalho não foi fruto individual. Foram várias as pessoas que contribuíram e participaram da construção deste projeto e, ao chegar ao final, agradecê-las aqui é também demonstrar que o ato da pesquisa não se faz só.

Inicialmente, agradeço a Deus, por me guiar e me dar forças em todos os momentos deste trabalho e da vida e por me conceder a serenidade necessária para aceitar as coisas que não puderam ser modificadas.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela promoção e realização deste doutorado.

À Professora Dr<sup>a</sup> Rejane Pereira Neves, pela orientação e formação acadêmica proporcionada desde a graduação. Sinto-me privilegiada por ter sido orientada por uma professora tão competente e generosa na partilha de seus conhecimentos.

Ao Professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, pela oportunidade de realizar este projeto junto ao HEMOPE.

Aos que fazem o Laboratório de Micologia Médica, ao chefe do laboratório Prof. Armando Marsden e à Prof.<sup>a</sup> Oliane Magalhães, agradeço pelo carinho, ensinamentos.

A todos os amigos do Departamento de Micologia por todos os momentos de descontração proporcionados.

Aos meus amigos do Laboratório Central, Gabi, Nadja, Júlio pela ajuda e apoio prestados ao longo dessa etapa.

Aos meus pais, Péricles (*In Memoriam*) e Ermira. Reconheço seus esforços em cada etapa da minha formação e a satisfação em cada conquista, vocês sempre me deram o apoio necessário.

Aos meus irmãos (Túlio e Stéphanie) por todo incentivo.

A Odnilson, por compartilhar comigo as conquistas e durezas da vida. Pessoa com quem a cada dia aprendo mais sobre a vida, o amor e o companheirismo. Juntos, o melhor de nós, Mateus.

A Mateus, por encher de alegria os meus dias e por me fazer sentir a mais pura forma de amor.

## RESUMO

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia hereditária, ocasionada por mutação que provoca alteração dos eritrócitos. A ocorrência de vaso-oclusões, pode conduzir a formação de úlceras em membros inferiores (UMIs) associadas a infecções secundárias. Considerando que a resposta às infecções é dependente da ação de proteínas, como a Lectina Ligadora de Manose (MBL), é importante analisar polimorfismos do gene que a codifica. Assim, a pesquisa teve como objetivo determinar a relação entre a fisiopatologia das UMIs e infecções microbiológicas em pacientes atendidos no HEMOPE portadores de anemia falciforme, correlacionando com possível polimorfismo do gene *MBL2* e caracterizar os agentes fúngicos quanto à formação de biofilme e sensibilidade antifúngica. As amostras provenientes das UMIs foram coletadas e processadas para exame direto e cultura. Os fungos foram avaliados pelo cristal violeta para a formação de biofilme e conforme o CLSI, a susceptibilidade. Para verificação de índices hematimétricos e moleculares foram coletadas amostras sanguíneas. Os pacientes apresentaram nas UMIs bactérias e fungos. Todos os isolados fúngicos formaram biofilme e foram sensíveis à anidulafungina e a ciclopirox olamina, variando em sensível e resistente aos outros antifúngicos. Não houve significância entre os haplótipos  $\beta^S$  e polimorfismos no gene *MBL2* com a etiofisiopatologia das UMIs ou com as infecções microbianas. Os resultados mostram a necessidade de acompanhamento das UMIs de pacientes com anemia falciforme através de exames microbiológicos periódicos para prevenção do possível risco de septicemia.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme. Úlcera de membro inferior. Infecção microbiológica. Biofilme. Susceptibilidade antifúngica. Polimorfismo do gene *MBL2*.

## ABSTRACT

Sickle cell disease is an inherited hemoglobinopathy, caused by mutation that causes red blood cells change. The vaso-occlusions occur, can lead to ulcers in the lower limbs (UMIs) associated with secondary infections. Whereas the response to infections is dependent on the protein action, such as binding lectin of Mannose (MBL), it is important to analyze gene polymorphisms that encodes. Thus, the research aimed to determine the relationship between the pathophysiology of UMIs and microbiological infections in patients treated at HEMOPE sickle cell disease, correlating with possible polymorphism *MBL2* gene and characterize the fungal agents on the biofilm formation and sensitivity antifungal. Samples from the UMIs were collected and processed for direct examination and culture. The fungi were assessed by crystal violet for formation of biofilm and as CLSI, susceptibility. For verification hematimetric and molecular indices blood samples were collected. Patients presented in UMIs bacteria and fungi. All fungal isolates formed biofilm and were sensitive to anidulafungin and ciclopirox olamine, varying in sensitive and resistant to other antifungals. There was no significant difference between the  $\beta^S$  haplotypes and polymorphisms in the gene *MBL2* with etiopathophysiology of UMIs or microbial infections. The results show the need for monitoring of UMIs of sickle cell patients through regular microbiological tests to prevent the possible risk of septicemia.

Keywords: Sickle cell disease. Ulcers in the extremities. Microbiological infection. Biofilm. Antifungal susceptibility. Polymorphism *MBL2* gene.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - CLUSTER  $\beta$  MOSTRANDO OS SÍTIOS POLIMÓRFICOS ESTUDADOS NA DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS  $\beta^S$  SEGUNDO SUTTON ET AL. (1989)..... 78**
- FIGURA 2 - ÚLCERA DE MEMBRO INFERIOR ESQUERDO CIRCUNFERENCIAL, MÉDIO-LATERAL, OCUPANDO 2/3 INFERIORES DA PERNA, COM BORDOS IRREGULARES E ÁREAS DE HEMOSSIDEROSE PERILESIONAIS. PODE-SE OBSERVAR AINDA A PRESENÇA DE TECIDO DE GRANULAÇÃO IRREGULAR E EXSUDATO DIFUSO DE COLORAÇÃO AMARELO-ESBRANQUIÇADO..... 85**
- FIGURA 3 - A – EXAME DIRETO DE AMOSTRA DE SECREÇÃO OBTIDA DE ÚLCERA DE MEMBRO INFERIOR DE EVIDENCIANDO CÉLULAS DE LEVEDURAS BROTANTES, OVAIS E HIALINAS E PRESENÇA DE PSEUDOHIFAS, ALÉM DE BACTÉRIAS; B – PRESENÇA DE FILAMENTOS HIALINOS..... 86**
- FIGURA 4 - PERFIS DE AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES ISSR DE ISOLADOS DE *CANDIDA DUOBUSHAEMULONII* UTILIZANDO OS INICIADORES GACA4 (A), GTG5 (B) E M13 (C). M: MARCADOR DE PARES DE BASE 10KB; 1 E 2: ISOLADOS DE *C. DUOBUSHAEMULONII* PROVENIENTES DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME; D E E: REPRESENTANDO UMI DIREITO E ESQUERDO; CN: CONTROLE NEGATIVO..... 88**
- FIGURA 5 - FORMAÇÃO DE BIOFILME COM DIFERENTES INTENSIDADES EXPRESSAS POR ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS A PARTIR DE UMIS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ACOMPANHADOS NO HOSPITAL DE HEMATOLOGIA DA FUNDAÇÃO HEMOPE (HEMOPE)..... 89**

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE $B^S$ EM DIVERSAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS.....	30
TABELA 2 - INTERPRETAÇÃO DE TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DE ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> FRENTE À ANIDULAFUNGINA SEGUNDO CLSI (2012) DOCUMENTO M27-S4.....	76
TABELA 3 - INTERPRETAÇÃO DE TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DE ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> SPP. FRENTE A FLUCONAZOL E VORICONAZOL CLSI (2012) DOCUMENTO M27-S4.....	76
TABELA 4 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DO <i>CLUSTER</i> $\beta$ : LOCALIZAÇÃO REFERENTE AO <i>CLUSTER</i> $\beta$ NO CROMOSSOMO 11 DEPOSITADOS NO BANCO DE DADOS NCBI (ID: U01317).....	79
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DAS REAÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DO <i>CLUSTER</i> DA GLOBINA $\beta$ .....	80
TABELA 6 - CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DO <i>CLUSTER</i> DA GLOBINA $\beta$ .....	80
TABELA 7 - TAMANHO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS APÓS A CLIVAGEM COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	81
TABELA 8 - INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DO GENE <i>MBL2</i> .....	83
TABELA 9 - NÍVEIS DE PRODUÇÃO DE MBL FUNCIONAL SEGUNDO A PRESENÇA DOS GENÓTIPOS PARA O GENE <i>MBL2</i> .....	83
TABELA 10 - BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE SECREÇÃO DE ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.....	86

TABELA 11 - ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> ISOLADAS EM ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ACOMPANHADOS NO HOSPITAL DE HEMATOLOGIA DA FUNDAÇÃO HEMOPE (HEMOPE).....	87
TABELA 12 - NÚMERO DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS EM ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES DE PACIENTES ACOMPANHADOS NO HOSPITAL DE HEMATOLOGIA DA FUNDAÇÃO HEMOPE (HEMOPE).....	87
TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> PROVENIENTES DE UMIS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ACOMPANHADOS NO HOSPITAL DE HEMATOLOGIA DE PERNAMBUCO (HEMOPE) FRENTE À DROGAS ANTIFÚNGICAS BASEADO NO CLSI (2008) E (2012).....	90
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DOS DADOS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DOS PACIENTES PORTADORES DE AF COM E SEM UMIs.....	91
TABELA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS $\beta^S$ ENTRE OS CASOS (60 ALELOS) E CONTROLES (120 ALELOS).....	91
TABELA 16 - GENÓTIPO $\beta^S$ DOS 90 PACIENTES ESTUDADOS.....	92
TABELA 17 - COMPARAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO CAR/CAR E OS DEMAIS GENÓTIPOS $\beta^S$ NOS GRUPOS DE PACIENTES COM E SEM ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES.....	92
TABELA 18 - FREQUÊNCIAS DE GENÓTIPOS E ALELOS RELACIONADOS À REGIÃO PROMOTORA (-550 E -221) E ÉXON 1 DE POLIMORFISMOS DO GENE <i>MBL2</i> EM PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME COM E SEM ÚLCERAS DE MEMBRO INFERIOR ATENDIDOS NO HEMOPE.....	94
TABELA 19 - HAPLÓTIPOS DO GENE <i>MBL2</i> CORRELACIONADOS COM NÍVEIS SÉRICOS DE MBL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME COM E SEM UMIS ATENDIDOS NO HEMOPE.....	95
TABELA 20 - FREQUÊNCIAS DE GENÓTIPOS E ALELOS RELACIONADOS A REGIÃO PROMOTORA (-550 E -221) E ÉXON 1 DE POLIMORFISMOS DO GENE <i>MBL2</i> EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ATENDIDOS NO HEMOPE.....	96

**TABELA 21 – HAPLÓTIPOS DO GENE *MBL2* CORRELACIONADOS COM NÍVEIS SÉRICOS DE MBL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ATENDIDOS NO HEMOPE..... 97**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI	<i>“Brain Heart Infusion”</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHC	2,5-Ácido dihidroxibenzóico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HbF	Hemoglobina fetal
pH	Potencial hidrogeniônico
HbS	Hemoglobina S
UMIs	Úlceras de membros inferiores
SNPs	Polimorfismos de base única
MBL	Lectina ligadora de manose
<i>MBL2</i>	Gene que codifica a lectina ligadora de manose
CNS	Conselho Nacional de Saúde
HEMOPE	Hospital de Hematologia de Pernambuco
ITS	Espaçador ribossomal interno transcrito
Hb	Hemoglobina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RAPD	Ampliação Randômica de DNA Polimórfico
SAD	Sabouraud dextrose Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
YEPD	Meio dextrose peptona extrato de levedura

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	18
2.1 ANEMIA FALCIFORME.....	18
2.1.1 Considerações gerais.....	18
2.1.2 Epidemiologia.....	20
2.1.3 Fisiopatologia.....	23
2.1.4 Haplótipos do gene $\beta^s$ .....	27
2.1.5 Manifestações Clínicas.....	30
2.1.6 Formação de biofilme.....	38
2.1.7 Susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> .....	41
2.2 LECTINA LIGADORA DE MANOSE.....	52
2.2.1 Polimorfismo no gene MBL2 e a deficiência de MBL.....	56
2.2.2 Lectina Ligadora de Manose e a associação com doenças.....	58
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	63
3.1 OBJETIVO GERAL.....	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	65
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	65
4.2 PACIENTES.....	65
4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	65
4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	66
4.4.1 Exame bacteriológico.....	66
4.4.2 Exame micológico.....	66
4.5 ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA.....	72
4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	73
4.7 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> .....	74
4.7.1 Preparação dos antifúngicos.....	74
4.7.2 Meio de cultivo.....	74
4.7.3 Preparação do inóculo.....	75
4.7.4 Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> .....	75
4.8 ANÁLISE HEMATOLOGICA, BIOQUÍMICA E CLÍNICA.....	76
4.9 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DOS PACIENTES.....	77
4.10 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS $B^s$ – PCR E <i>RESTRICTION</i> <i>FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i> (RFLP).....	78
4.11 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO - <i>RESTRICTION FRAGMENT LENGTH</i> <i>POLYMORPHISM</i> (RFLP).....	80
4.12 PCR EM TEMPO REAL E A GENOTIPAGEM DO GENE <i>MBL2</i> .....	81
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84
<b>5. RESULTADOS</b> .....	84
5.1 PACIENTES E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES.....	84

5.2 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS.....	85
<b>5.2.1 Análise de similaridade genética entre isolados de <i>Candida duobushaemulonii</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>5.2.2 Caracterização dos agentes etiológicos quanto a capacidade de produzir biofilme.....</b>	<b>88</b>
<b>5.2.3 Susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>89</b>
5.3 CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.....	90
5.4 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS B <sup>S</sup> .....	91
5.5 POLIMORFISMO DO GENE <i>MBL2</i> .....	92
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>126</b>
<b>ANEXO A - PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ENVOLVENDO SERES HUMANOS DO HEMOPE.....</b>	<b>128</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme, uma hemoglobinopatia hereditária é caracterizada por um tipo de hemoglobina (Hb) mutante designada hemoglobina S ou HbS, a qual provoca alteração dos eritrócitos, fazendo-os tomar a forma de “foice” ou “meia-lua” (Di Nuzzo; Fonseca, 2004; Serjeant *et al.*, 2005). A causa da alteração hemoglobínica é a substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia polipeptídica  $\beta$  ( $\beta^6$  GAG→GTG; glu6val), com conseqüente modificação fisicoquímica da molécula e assim produzindo a hemoglobina S (Fathallah; Atweh, 2006; Kato *et al.*, 2007; Driss *et al.*, 2009; De Franceschi *et al.*, 2011).

Em condições específicas, como baixas concentrações de oxigênio, diminuição do pH, baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>), a HbS sofre polimerização, formando estruturas filamentosas que se depositam no interior das hemácias, modificando sua forma e as tornando falciformes (Stuart e Nagel, 2004; Nolan *et al.*, 2005). A hemoglobina S desoxigenada, em conjunto com outros mecanismos fisiológicos como alterações estruturais e funcionais da membrana eritrocitária, concentração de Hb fetal e co-hereditariedade com a talassemia alfa ( $\alpha$ ), assume papel central na fisiopatologia da anemia (Kato *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2008).

O fenômeno de falcização pode ser revertido quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos. No entanto, falcizações sucessivas conduzem alteração na estrutura da membrana da hemácia, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas que, ao sofrerem interação com células endoteliais, leucócitos, plaquetas e outros componentes do plasma, promovem as manifestações vaso-oclusivas desta anemia (Nolan *et al.*, 2005; Frenette e Atweh, 2007).

A ocorrência de vaso-oclusões, principalmente em pequenos vasos, que diminuem a biodisponibilidade de óxido nítrico, representam os eventos determinantes da maioria dos sinais e sintomas da anemia falciforme, como crises algicas, episódios hemolíticos, síndrome torácica aguda, seqüestro esplênico, necrose asséptica de fêmur e úmero, retinopatia, insuficiência renal

crônica, autoespectomia, priapismo, acidente vascular cerebral e úlceras de membros inferiores (UMIs) entre outros (Kutlar, 2007; Kato *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2008; Cajado *et al.*, 2011).

Quadros clínicos diversos e níveis variados de (HbF) estão associados a diferentes haplótipos do gene  $\beta^S$ , definidos pelos polimorfismos do DNA ligados ao complexo da  $\beta$ -globina. A mesma mutação  $\beta^S$  aparece independentemente em pelo menos cinco diferentes grupos populacionais de acordo com a região de origem e local de predominância, sendo estes denominados de Bantu (República da África Central - CAR), Benin, Senegal, Camarões e Árabe-Indiano (Saudi) (Sutton *et al.*, 1989; Silva; Gonçalves, 2009; Steinberg; Nagel, 2009; Rusanova *et al.*, 2011).

Aspectos fisiopatológicos da anemia falciforme como a vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos podem levar a formação de UMIs. Esta é uma complicação freqüente que apresenta cicatrização lenta, alta taxa de recorrência (Serjeant *et al.*, 2005; Paladino, 2007) e ocorre entre 8% a 10% dos pacientes homozigotos, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A variabilidade clínica é determinada por diferenças genéticas e condições ambientais e é predominante no sexo masculino, acima dos 10 anos de idade (Koshy, 1989; Paladino, 2007; Steinberg, 2008).

Nos pacientes falciformes as infecções bacterianas em UMIs são ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* beta-hemolíticos e *Salmonella*, entretanto não há relatos de infecções fúngicas investigadas ou diagnosticadas neste grupo de pacientes (Serjeant *et al.*, 2005).

A resposta imune às infecções microbianas é dependente da ação inicial de certos tipos de proteínas, como a Lectina Ligadora de Manose - "Mannose-Binding Lectin" (MBL), como componente inato, controlada em nível genético. O gene da Lectina Ligadora de Manose (*MBL2*) codifica uma proteína capaz de reconhecer a manose na superfície de patógenos, promovendo tanto opsonização como a ativação do sistema complemento (Heitzeneder *et al.*, 2012; Dinasarapu *et al.*, 2013). A presença de variações, principalmente polimorfismos de base única (SNPs), pode determinar o curso do

desenvolvimento da infecção (Amim *et al.*, 2007; Auriti *et al.*, 2010; Henic *et al.*, 2010; Heitzeneder *et al.*, 2012).

Polimorfismos localizados na região promotora e no éxon 1 desse gene têm sido alvo de diversos estudos e revelam a importância para esclarecer situações de maior susceptibilidade à infecções virais, fúngicas e bacterianas. Contudo, não foi avaliada a possível correlação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e a susceptibilidade às infecções microbianas em pacientes com anemia falciforme, em particular às determinadas por fungos (Klotman; Chang, 2006; Takahashi *et al.*, 2006; Henic *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. ANEMIA FALCIFORME

#### 2.1.1 Considerações gerais

A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia hereditária, com padrão de herança autossômico recessivo, atribuída a uma alteração molecular específica. É a doença hematológica mais comum no mundo e a mais prevalente na população brasileira (Gumiero *et al.*, 2007; Júnior *et al.*, 2007; Bandeira *et al.*, 2008). Esta doença surgiu nos países do centro-oeste africano, na Índia e no leste da Ásia, há cerca de 50 a 100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico (WHO, 1982; Naoum, 1997; Pitombeira; Neto, 2002; Neto *et al.*, 2005).

A doença foi primeiramente descrita em 1910, ao se analisar a forma anormal dos eritrócitos do sangue periférico de um estudante negro procedente da Jamaica, portador de um grave quadro anêmico acompanhado de icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores (Herrick, 1910). Em virtude da aparência peculiar das hemácias observadas no caso, foi criado por Herrick o termo *forma de foice* para descrever a morfologia das referidas células. Entretanto, diante dos sintomas apresentados pelo paciente, o pesquisador não estava seguro para afirmar que se tratava de uma doença específica ou manifestações de outra patologia (Herrick, 1924; Stuart; Nagel, 2004; Frenette; Atweh, 2007).

Em 1945, Linus Pauling apresentou a hipótese de que a doença talvez tivesse origem na anormalidade da molécula de hemoglobina. Esta hipótese foi validada em 1949, pela demonstração da migração eletroforética diferencial observada entre a hemoglobina normal e a hemoglobina S e, confirmada em 1956, quando Vernon Ingram descobriu que o defeito responsável pela doença era a substituição de um único aminoácido na molécula de hemoglobina de células falciformes (Stuart e Nagel, 2004; Frenette e Atweh, 2007). Esta foi a primeira demonstração de que a mutação de um gene poderia produzir uma sequência alterada de aminoácidos, dando origem ao conceito de doença molecular (Farah, 2000; Galiza Neto; Pitombeira, 2003)

A hemoglobina é uma proteína globular com peso molecular aproximado de 64 kilodaltons (kDa), representando 95% das proteínas dos eritrócitos. Sua principal função é a absorção, transporte e a distribuição de oxigênio para os diversos tecidos do organismo (Bunn; Forget, 1986; Macka; Katoa, 2006).

A molécula de Hb é formada por quatro subunidades, sendo cada uma composta por uma cadeia polipeptídica denominada globina e um grupo heme que é formado pelo complexo ferro - protoporfirina IX, responsável pela cor vermelha do sangue. As cadeias globínicas se agrupam normalmente em pares, de acordo com o tipo de hemoglobina, sendo um par denominado de cadeia alfa ( $\zeta$  – zeta,  $\alpha$  – alfa) e outro de cadeias beta ( $\epsilon$  – épsilon,  $\gamma$  - gama,  $\delta$  – delta,  $\beta$  – beta) (Dacie; Lewis, 1984; Fairbanks; Klee, 1987; Galiza Neto; Pitombeira, 2003; Frenette; Atweh, 2007). Combinações entre as cadeias globínicas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos, desde o período embrionário até a fase adulta, sendo produzidas no decorrer das etapas do desenvolvimento humano (Marengo-Rowe, 2006).

A síntese das cadeias globínicas é regulada por grupamentos – *clusters* – de genes de famílias diferentes. Os genes que codificam as cadeias  $\alpha$  estão localizados na região telomérica em um segmento de DNA de 40 kilobases (kb) no braço curto do cromossomo 16. Já os genes que codificam as cadeias  $\beta$  estão localizados em um segmento de DNA de 60 Kb no braço curto do cromossomo 11 (Costa; Sonati, 2007; Wenning; Sonatii, 2007; Sonati; Costa, 2008).

Diferentes hemoglobinas foram identificadas durante o processo de desenvolvimento ontogênico humano, sendo que as hemoglobinas Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) são encontradas somente nos primeiros estágios da embriogênese até três meses do início da evolução gestacional. A hemoglobina fetal (HbF) ( $\alpha_2\gamma_2$ ) é produzida na vida intra-uterina, decaindo logo após os seis meses de vida e correspondendo a 1% do total de hemoglobina em indivíduos adultos saudáveis. As hemoglobinas A1 ( $\alpha_2\beta_2$ ) e A2 ( $\alpha_2\delta_2$ ) estão presentes na vida adulta, alcançando níveis que variam entre 96% a 98% e 2,5% a 3%, respectivamente (Galiza Neto; Pitombeira, 2003).

A HbS, por sua vez, pode induzir na população as formas clínicas assintomática ou doença (SS, SC, SD e S $\beta$ ). Os pacientes que apresentam a

forma assintomática são denominados portadores do traço falciforme. Estes portam um patrimônio genético representado pela HbA associado à HbS, que resulta em um fenótipo normal (Sommer *et al.*, 2006; Frenette; Atweh, 2007).

A denominação anemia falciforme é reservada à forma clínica sintomática em que existe homozigose da HbS, herdados de ambos os pais, ou seja, HbSS, e os pacientes desenvolvem sintomas característicos da doença (Crery *et al.*, 2007; Gumiero *et al.*, 2007; Júnior *et al.*, 2007).

### 2.1.2 Epidemiologia

A hemoglobina S possui distribuição mundial, sendo que as mais altas prevalências do gene  $\beta^S$ , caracterizado pela identificação do heterozigoto ou portador do traço falcêmico (Hb AS), superam 40% em alguns vilarejos do leste africano e países da África Equatorial. Também, em países asiáticos como Arábia Saudita, Emirados Árabes e regiões da Índia a prevalência da hemoglobina AS atinge até 20% da população. Em regiões próximas ao extremo asiático, como o Nepal, a frequência do  $\beta^S$  é de 5%. Na região que circunda o mar mediterrâneo, incluindo a costa norte da África, Turquia, Líbano, Síria e Grécia, bem como em Portugal e Irã, as prevalências situam-se entre 2% e 5%. Entretanto é importante destacar que dentro destas regiões a prevalência varia consideravelmente entre vilarejos ou grupos étnicos, como são os casos do Eti-Turcos na Turquia (14%), e entre os Khazranah na Síria (25%) (Naoum, 2000; Metcalfe *et al.*, 2007).

Em todas as regiões descritas, pode-se atribuir a hipótese malária com fator das altas frequências do gene  $\beta^S$ , porém a presença da HbS no “novo mundo”, onde se incluem Estados Unidos da América, Venezuela, Colômbia, Jamaica, Cuba e Brasil é notadamente decorrente da miscigenação populacional com ativa participação de escravos africanos (Naoum, 2000; Nuzzo; Fonseca, 2004).

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, 5% da população mundial é portadora do gene para hemoglobinopatias, e a cada ano nascem aproximadamente 300.000 com desordens nas hemoglobinas. Desses, 200.000 casos de anemia falciforme ocorrem na África (WHO, 2005).

A anemia falciforme afeta milhões de pessoas no mundo e ocorre em 1 a cada 500 nascimentos de afro-americanos e em cada 1.000 - 4.000 nascimentos de hispano-americanos (Gonçalves *et al.*, 2003). Mais de 50.000 americanos são afetados pela doença, tornando-a uma das desordens genéticas mais relevantes nos Estados Unidos (Ashley-Koch; Yahg; Olney, 2000). Na Venezuela, estudo epidemiológico mostrou frequência de 5% nos mestiços e afro-americanos, em algumas regiões, como na costa norte e central, a frequência pode chegar a 12% (Moreno *et al.*, 2002).

No Brasil, a HbS pode ser encontrada em todo o território nacional, independente da cor da pele ou etnia e apresenta significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência e da morbimortalidade que apresenta desta forma, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (Paiva; Silva *et al.*, 1993; Gómez - Chiari *et al.*, 2003; Bandeira *et al.*, 2007; Bandeira *et al.*, 2008).

Segundo Ramalho (1986), a anemia falciforme é a doença hereditária mais prevalente no Brasil, chegando a acometer 0,1 a 0,3% da população negra, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população.

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, o gene pode ser encontrado em frequências de 2% a 6% nas regiões do país, aumentando para 6,9% a 15% na população afrodescendente brasileira. Além disso, a prevalência referente à doença em diferentes regiões brasileiras permite estimar a existência de 2 milhões de indivíduos portadores do gene HbS no Brasil, sendo 10.000 portadores de anemia falciforme e ocorrendo nascimento de 3.500 casos novos anuais (Brasil, 2001; Gonçalves *et al.*, 2003; Brasil, 2007; Cançado e Jesus *et al.*, 2007).

Apesar da ampla difusão no Brasil, a HbS apresenta distribuição bastante heterogênea, devido a diferentes origens raciais e diversificado grau de miscigenação da população. Assim, a prevalência tanto de heterozigotos quanto de homozigotos para a HbS é maior nas regiões Sudeste e Nordeste (Di Nuzzo: Fonseca, 2004; Adorno, 2005; Costa; Sonati, 2008).

Na região Sudeste, Ducatti *et al.* (2001) detectaram a presença de 3,7% de traços de HbS em 913 amostras de recém-nascidos em São José do Rio

Preto. Brandelise *et al.* (2004) descreveram a prevalência de 0,02% para a doença falciforme (SS e SC) ao estudarem 281.884 recém-nascidos durante o programa de triagem neonatal em Campinas. No estado do Rio de Janeiro, foi observada a presença de 4,7% de portadores do traço falciforme em um estudo com 99.260 recém-nascidos e uma incidência de um caso novo de anemia falciforme para cada 1.196 nascimentos (Lobo *et al.*, 2003). No estado de Minas Gerais, o programa de triagem neonatal detectou incidência de um caso novo de homocigoto para cada 2.800 nascimentos (Paixão *et al.*, 2001).

Na região Nordeste, Bandeira *et al.* (1999) descreveram a frequência de 5,3% para os heterocigotos (AS) e de 0,2% para a doença falciforme em 1.988 recém-nascidos no estado de Pernambuco. No entanto Araújo *et al.* (2001) estudando 1.500 recém-nascidos de quatro maternidades públicas de Recife/Pernambuco, encontraram 3,47% de crianças portadoras do traço falciforme. Neste estado, a anemia falciforme afeta 1/1400 nascidos vivos (Brasil, 2008). Em Natal, Rio Grande do Norte, Araújo *et al.* (2004) encontraram 1,5% de recém-nascidos heterocigotos AS e 0,05% de portadores de anemia falciforme. No estado da Bahia, onde se encontra uma significativa heterogeneidade genética, Adorno *et al.* (2005) descreveram a frequência de 9,8% de heterocigotos AS e 0,2% de portadores de anemia falciforme SS em uma maternidade pública da cidade de Salvador, Bahia. Em um estudo de triagem neonatal na região do Recôncavo Baiano, Silva *et al.* (2006), descreveram que entre 9,5 e 11,4% dos recém-nascidos são portadores de hemoglobina S. Em Fortaleza, Ceará, Pinheiro *et al.* (2006) encontraram a prevalência de 4,1% de portadores de HbS em 389 amostras de recém-nascidos.

Devido à elevada incidência de indivíduos falcêmicos e de portadores do traço falciforme no Brasil, associado ao fato de que praticamente todos os indivíduos heterocigóticos desconhecem que são portadores assintomáticos, no casamento ao acaso destes indivíduos, podem nascer, com a probabilidade de 25%, portadores de anemia falciforme. Considerando a necessidade de maior atenção a estes casos, as hemoglobinopatias foram incluídas no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) por meio da Portaria GM/MS nº 822. Este programa propõe o exame dos pais a partir da identificação de

heterozigotos, não recomendado a ampliação da triagem para outros familiares (Ramalho *et al.*, 2003; Cançado, 2007; Bandeira *et al.*, 2008).

A mortalidade nos cinco primeiros anos de vida é de cerca de 25% a 30%, contudo o diagnóstico precoce da anemia falciforme permite a introdução de antibioticoterapia profilática e programas adequados de vacinação, permitindo reduzir para aproximadamente 3% dos óbitos (Iníguez *et al.*, 2003; Cançado e Jesus, 2007).

Segundo Platt (1994), a idade mediana de morte em um grupo de 3764 pacientes com anemia falciforme nos Estados Unidos da América foi de 42 anos (homens) e 48 anos (mulheres). As manifestações clínicas dessa desordem ocorrem a partir do primeiro ano e se estendem durante toda a vida (Paiva *et al.*, 1993). No Brasil, Alves (1996) observou que 78,6% dos óbitos devido à doença falciforme ocorreram até os 29 anos de idade, e 37% concentraram-se nos menores de nove anos. A elevada letalidade, que abrange especialmente jovens, reflete a gravidade da doença.

Estudos recentes sobre a expectativa de vida do brasileiro com anemia falciforme, apesar de estarem evidenciando um aumento progressivo, ainda registram pequenos percentuais acima de 40 ou 50 anos demonstrando que estes pacientes falecem precocemente (Martins *et al.*, 2010; Felix *et al.*, 2010).

### **2.1.3 Fisiopatologia**

As manifestações clínicas da anemia falciforme derivam diretamente da anormalidade molecular apresentada pela presença da Hb S. A hemoglobina mutante possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da normal devido à perda de duas cargas elétricas negativas por molécula, decorrente da substituição de um único aminoácido que compõe a cadeia da beta globina. Tal hemoglobina exibe ainda diferente estabilidade e solubilidade, demonstrando uma forte tendência à formação de polímeros quando na sua forma deoxiemoglobina (Bunn; Forget, 1986; Galiza Neto; Pitombeira, 2003; Sonati; Costa, 2008). Desta forma, quando os glóbulos vermelhos estão em baixas concentrações de oxigênio, a alteração estrutural da HbS favorece uma série de mudanças físico-químicas na estrutura da hemácia, ocasionando a

alteração da forma eritróide devido à formação de longos polímeros que se depositam nestas células. A falcização altera as propriedades da membrana celular, reduzindo sua flexibilidade e promovendo maior aderência ao endotélio vascular (Costa, 2005; Zhou *et al.*, 2011).

A velocidade e a extensão da formação de polímeros no interior das hemácias dependem primariamente de três variáveis: grau de desoxigenação, concentração intracelular de HbS e presença de HbF (Stuart; Naguel, 2004; Steinberg, 2005; De Franceschi *et al.*, 2011).

O fenômeno de falcização pode ser revertido quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos e a repetição sucessiva deste processo altera a estrutura da membrana eritrocítica, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas. Em larga escala, esses eritrócitos danificados promovem efeitos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando o fenótipo principal da anemia falciforme (Steinberg, 2008)

A forma falcizada da hemácia é originalmente a causa da obstrução da microcirculação, resultando em crise vaso-oclusiva em pequenos e, algumas vezes, grandes vasos. Este evento fisiopatológico é determinante da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme, contribuindo para sua morbidade e mortalidade (Rosse *et al.*, 2000; Galiza Neto; Pitombeira, 2003 Stuart; Naguel, 2004).

A vaso-oclusão e a isquemia tecidual na anemia falciforme envolvem não somente a polimerização da HbS, mas também interações entre os eritrócitos, endotélio, plaquetas, leucócitos e fatores do plasma. A polimerização da HbS é o mais importante fator no ciclo da falcização (Vichinski, 2002; Zen *et al.*, 2004; Madigan; Malik, 2006; Chiang; Frenette, 2005).

Por se apresentarem como células rígidas e deformadas, os eritrócitos além de levarem à obstrução mecânica da micro-vasculatura expressam um conjunto de moléculas que favorece a sua adesão ao endotélio vascular. A adesão leucócito-endotelial pela formação de agregados hetero-celulares (leucócitos e células falcizadas) contribui para a obstrução, resultando em hipóxia local, aumento na formação de polímeros de HbS e propagação da oclusão à vasculatura adjacente (Stuart; Naguel, 2004).

Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem principalmente em órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é lento e a tensão de oxigênio e o pH são baixos. A hipóxia decorrente da oclusão vascular gera infartos teciduais e orgânicos e proporciona, principalmente, sintomatologia de dor ou danos teciduais crônicos irreversíveis em alguns órgãos (Naoum, 1997; Zago; Pinto, 2007).

A homeostase anormal de íons celulares e a desidratação levam a um aumento da concentração intracelular de HbS, favorecendo a polimerização. Estudos demonstraram que o eritrócito desidratado apresenta papel fundamental nas manifestações clínicas agudas e crônicas na anemia falciforme. (Bunn, 1997; Joiner *et al.*, 2004; Chiang; Frenette, 2005; Sonati; Costa, 2008; De Franceschi *et al.*, 2011).

As deformações celulares que alteram as trocas iônicas e afetam a permeabilidade celular tem como consequência lesões na membrana, o que também contribui para diminuir a vida das células. Os eritrócitos falcizados são rapidamente retirados da circulação, principalmente por macrófagos do sistema monocítico-macrofágico, com consequente hemólise precoce (Naoum, 1997; Smeltzer *et al.*, 1998; Santos, 1999; Silva; Marques, 2007). O estado inflamatório crônico que ocorre nos pacientes com anemia falciforme decorre de diversos fatores que se interligam e retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente (Zago; Pinto, 2007).

Fatores, como mediadores inflamatórios que ativam as células endoteliais, acentuam a adesão das células e também desencadeiam episódios vaso-oclusivos (Rosse *et al.*, 2000; Solovey *et al.*, 2004). Moléculas pró-inflamatórias induzem a ativação do canal de Gardos, o qual pode explicar a associação entre inflamação, vaso-oclusão e hemólise aumentada, algumas vezes vista durante quadros infecciosos (Stuart e Naguel, 2004). Durante estresse inflamatório, a adesão das células falciformes ao endotélio pode se elevar como resultado do aumento de proteínas do plasma, bem como devido a maior expressão de moléculas de adesão do tipo integrinas (Bunn, 1997; Solovey *et al.*, 2004; Chiang; Frenette, 2005).

A transmigração de neutrófilos pelas junções endoteliais também aumenta a inflamação na microvasculatura. Recente atenção tem sido dada a

desregulação do tônus vasomotor pela perturbação em mediadores vasodilatadores como o óxido nítrico (Stuart; Naguel, 2004). Além disso, vários estudos têm sugerido que a biodisponibilidade do óxido nítrico está reduzida na anemia falciforme. Ele é um gás sinalizador, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo normal, com tempo de meia vida de segundos, desempenhando papel importante na fisiopatologia da anemia falciforme e no tratamento das crises vaso-oclusivas (Rubanyi; Vanhoutte, 1986; Gladwin; Schechter, 2001; Lopez *et al.*, 2003).

A redução do óxido nítrico na anemia falciforme seria consequência do processo de hemólise intravascular crônico que libera hemoglobina livre e arginase, enzima que utiliza o substrato usado para a produção deste óxido. A depleção de substrato e o sequestro de óxido nítrico causam redução local desta substância e vasoconstrição. O fenômeno de vasoconstrição, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização das hemácias (Nolan *et al.*, 2006; Zago; Pinto, 2007; Aslan; Freeman, 2007).

A menor disponibilidade de óxido nítrico também cursa com aumento de ativação plaquetária e de expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais (Conran *et al.*, 2003; Kaul *et al.*, 2004; Aslan e Freeman, 2007; Felix *et al.*, 2010). Segundo Chies; Nardi (2001), a anemia falciforme deve ser considerada uma doença inflamatória crônica, onde a gravidade das manifestações clínicas seria determinada por um estado pró-inflamatório amplificado, contribuindo para os episódios vaso-oclusivos, desempenhando assim, um importante papel na fisiopatologia da doença.

Terapias direcionadas para o restabelecimento da homeostase do óxido nítrico têm se mostrado promissoras em pacientes com anemia falciforme. Crianças com esta condição clínica em crises algicas agudas, após inalação de óxido nítrico, apresentaram tendência a menores escores de dor, além da diminuição da necessidade de analgésicos e, conseqüentemente, menor permanência hospitalar (Winer *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2007).

A ampla variabilidade clínica da anemia falciforme tem sido relacionada a numerosos aspectos condicionantes que podem intensificar ou diminuir os seus efeitos, estando relacionada a fatores genéticos e ou adquiridos. Entre os adquiridos destacam-se as condições climáticas, o nível sócio-econômico, as

variações na qualidade da alimentação, a prevenção de infecções e acesso a assistência médica (Zago, 2002; Zago: Pinto, 2007). Em relação às características geneticamente determinadas, têm importância na gravidade clínica: níveis de HbF, os haplótipos ligados ao grupamento do gene da  $\beta$ -globina, a co-existência de alfa talassemia e a deficiência na glicose-6-fosfato desidrogenase (Steinberg, 2001; Zago, 2002; Moreno *et al.*, 2002; Inati *et al.*, 2003).

#### **2.1.4 Haplótipos do gene $\beta^S$**

Embora todos os pacientes com anemia falciforme apresentem o mesmo defeito molecular, existe entre esses considerável variabilidade fenotípica. A diversidade clínica da doença varia de um curso clínico leve, com sobrevivência de 5 a 6 décadas, a cursos clínicos graves com significativo prejuízo aos órgãos e morte em idade relativamente jovem. Muitos dos avanços para compreender a heterogeneidade fenotípica na anemia falciforme foram realizados ao longo de 30 anos após a chegada da era molecular (Kutlar, 2007; Higgs; Wood, 2008).

Sintomas clínicos mais leves têm sido descritos em pacientes que apresentam  $\alpha$ -talassemia e altos níveis de HbF, ligados à presença de padrões de combinação de sítios polimórficos específicos, denominados haplótipos (Gonçalves *et al.*, 2003). Os haplótipos da globina  $\beta$  são definidos com o auxílio de endonucleases de restrição que quebra sítios polimórficos na região do gene  $\beta^S$ , localizado no cromossomo 11. Experimentalmente, a realização deste processo, possibilitou o mapeamento em torno do grupo de genes e evidenciou múltiplas mutações (Stuart *et al.*, 2004; Vision *et al.*, 2004).

A caracterização dos haplótipos é feita após a interpretação das leituras da PCR realizada para cada um dos sítios polimórficos, utilizando enzimas específicas. O resultado é comparado com um painel de reação previamente estabelecido e, desta forma, os haplótipos são identificados (Sutton *et al.*, 1989).

A descoberta dos haplótipos do gene  $\beta^S$  apresentou um importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elementos de estudo clínico, os quais podem

fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e seu nível de gravidade (Galiza Neto; Pitombeira, 2003; Vinson *et al.*, 2004).

Os haplótipos na anemia falciforme têm sido relatados em diferentes regiões do mundo, tendo sido classificados em cinco tipos diferentes de acordo com a origem étnica e geográfica onde predominam em: Senegal, Benin, CAR, Saudi e Camarões. O haplótipo Senegal (SEN) é encontrado no Atlântico Ocidental da África; Benin (BEN) no oeste da África; Bantu ou República Central Africana (CAR) na região oriental e centro-sul Africana; Árabe - Indiano ou Saudita na Índia e Península Árabe oriental e o menos frequente Camarões está restrito ao grupo étnico Africano Eton na costa oeste africana (Magaña *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2003; Inati *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2004; Bezerra *et al.*, 2007).

A maioria dos cromossomos com o gene  $\beta^S$  tem um dos cinco haplótipos comuns, contudo existe uma minoria de cromossomos, aproximadamente 5%, que estão associados com outros haplótipos, geralmente designados como atípicos, que são produzidos por diversos mecanismos genéticos, sendo a recombinação entre dois haplótipos  $\beta^S$  típicos o mais comum (Zago *et al.* 2000; Zago *et al.*, 2001).

Os diferentes haplótipos da anemia falciforme estão relacionados a um quadro clínico e níveis de HbF variados, sendo o haplótipo Senegal associado a níveis elevados de HbF (>15%) e curso clínico menos grave da doença; o Benin a níveis medianos de HbF (5 a 15%) e curso clínico intermediário; o Bantu ou República Central Africana a níveis diminuídos de HbF (<5%) e quadro clínico mais grave; e o haplótipo Árabe-Indiano apresenta níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo (Nagel, 1984; Powars, 1991; Rahgozar *et al.*, 2000; Steinerg 2005; Cajado *et al.*, 2011).

A hemoglobina fetal é considerada o mais potente modificador da doença e tem sido o modulador genético mais amplamente estudado na anemia falciforme (Steinberg, 2005). Polimorfismos na posição -158 no gene  $\gamma^G$  (C  $\rightarrow$  T) em portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano está fortemente associado com o aumento da expressão da globina  $\gamma^G$  e, conseqüentemente, altos níveis de HbF. Entretanto, mesmo em portadores deste polimorfismo,

existe uma diversidade considerável nos níveis de HbF, provavelmente devido a ação de outros elementos regulatórios (Steinberg, 2005).

A associação do haplótipo da globina  $\beta$  com a severidade clínica da anemia falciforme deve ser interpretada cautelosamente, pois o valor prognóstico de um haplótipo conhecido em um indivíduo é limitado. Estudos de diferentes grupos étnicos, com características hematológicas distintas, sugerem que o haplótipo da globina  $\beta$  pode ser utilizado como um marcador da doença (Steinberg, 2005).

O aumento dos níveis de HbF está associado à redução da morbidade e mortalidade da doença (Steinberg *et al.*, 2003). Diversos agentes citotóxicos, como a hidroxiuréia, têm sido utilizados e amplamente estudados no tratamento da anemia falciforme, pois estimulam a síntese de HbF (Steinberg, 2001a; Stuart; Nagel, 2004; Franceschi; Corrocher, 2004; Figueiredo, 2007; Platt, 2008).

A influência das migrações populacionais sobre a distribuição dos haplótipos nos continentes e países é outro aspecto a se observar. Do século XVI ao século XIX, aproximadamente 10 milhões de escravos africanos foram trazidos para as Américas, deste total, 400000 foram para os Estados Unidos e 3 milhões para o Brasil. Nos Estados Unidos o haplótipo Benin é o mais frequente, seguido pelo CAR e Senegal em proporções equivalentes (Zago; Silva; Franco, 1999). Nas Américas do Norte e Sul, no Caribe e no Reino Unido, o haplótipo Benin também é o mais frequente.

Estudos realizados em diversas regiões do Brasil mostram, numa visão geral, que o haplótipo mais frequente é o CAR, seguido do Benin. Os haplótipos Senegal e Camarões apresentam diferentes frequências dependendo da região (Tabela 1). No estado da Bahia, diferente dos demais estados, o haplótipo Benin está presente em frequência acima ou muito próxima da frequência do haplótipo CAR (Costa *et al.*, 1984; Gonçalves *et al.*, 2003; Adorno *et al.*, 2008). Em Fortaleza, os trabalhos revelam divergência quanto à ordem de frequência dos haplótipos identificados (Galiza Neto *et al.*, 2005; Silva; Gonçalves; Rabenhorst, 2009).

**Tabela 1** – Frequência dos haplótipos do gene  $\beta^s$  em diversas populações brasileiras.

Autor	Local	Nº de pacientes	Haplótipos $\beta^s$ (%)					
			CAR Atip	BEN	SEN	CAM	ARAB	
Costa <i>et al.</i> , 1984	São Paulo/SP	37	61,0	38,0	-	-	-	1,0
	Salvador/BA	36	49,0	51,0	-	-	-	-
Zago <i>et al.</i> , 1992	São Paulo/SP	37	66,2	23,0	1,3	-	-	9,5
Gonçalves <i>et al.</i> , 1994	São Paulo/SP	74	62,2	33,8	-	-	-	4,0
Ponte-de-Sousa <i>et al.</i> , 1998	Belém/PA	30	67,0	30,0	3,0	-	-	-
Gonçalves <i>et al.</i> , 2003	Salvador/Ba	80	48,1	45,6	0,63	-	-	5,63
Adorno <i>et al.</i> , 2004	Salvador/Ba	80	46,2	48,8	0,6	1,9	-	0,6
Galiza Neto <i>et al.</i> , 2005	Fortaleza/ CE	22	31,8	43,2	2,3	-	-	-
Cardoso e Guerreiro (2006)	Belém/PA	130	66,0	21,8	10,9	1,3	-	-
Fleury, 2007	Rio de Janeiro/RJ	74	54	44,6	1,4	-	-	-
Bezerra <i>et al.</i> , 2007	Recife/PE	74	81,1	14,2	-	0,8	-	3,9
Adorno <i>et al.</i> , 2008	Salvador/BA	125	41,6	55,2	0,4	1,2	0,4	1,2
Silva <i>et al.</i> , 2009	Fortaleza/CE	34	66,2	22,0	-	-	-	11,8
Cabral <i>et al.</i> , 2011	Natal/RN	47	75,5	12,8	-	6,4	-	5,3
Okumura: Lobo: Bonini-Domingos 2013	Rio de Janeiro/RJ	527	72,9	20,3	0,19	0,5	0,2	5,7
			6			7	8	

### 2.1.5 Manifestações Clínicas

A expressão clínica da anemia falciforme é bastante variável, com alguns pacientes tendo vida aparentemente normal, sem crises. Entretanto outros apresentam evolução desfavorável; com retardo no crescimento e desenvolvimento, além de alterações em vários órgãos, que são provenientes da hemólise contínua e dos fenômenos de vaso-oclusão ocorridos durante o curso da doença, evoluindo muitas vezes até a incapacitação física e mental do indivíduo (Weatherall: Provan, 2000; Hoffbrand *et al.*, 2005, Kato *et al.*, 2007).

Os elevados níveis de hemoglobina fetal nos eritrócitos protegem os recém-nascidos durante as primeiras 8 a 10 semanas de vida. Estes níveis declinam e as manifestações clínicas da anemia falciforme aparecem, sendo as alterações hematológicas detectáveis a partir da 10<sup>a</sup>-12<sup>a</sup> semanas de vida (Hoffbrand; Pettit, 1993; Galiza Neto; Pitombeira, 2002).

O paciente típico é assintomático, apresenta um estado de saúde razoável e estável durante a maior parte do tempo. Este estado de relativo bem-estar é interrompido periodicamente por crises que podem ter início súbito e, ocasionalmente, um desfecho fatal. O reconhecimento precoce e a subsequente avaliação clínica das crises são de extrema importância para a diminuição da morbi-mortalidade da anemia falciforme (Weatherall; Provan, 2000; Pitombeira; Neto, 2003).

Entre as manifestações clínicas mais frequentes da doença estão a anemia, crises aplásticas, crises álgicas, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, alterações pulmonares e oftalmológicas, priapismo, retardo no crescimento e desenvolvimento, bem como úlceras de membros inferiores. Além disso, o fenômeno vaso-oclusivo pode levar à destruição progressiva do baço e conseqüentemente à auto-esplenectomia, sendo responsável pela suscetibilidade aumentada à infecções, estando entre as principais causas de morte em todas as idades nesses indivíduos (Stuart; Nagel, 2004; Steinberg, 2005; Steinberg, 2008; Conran; Franco-Penteado; Costa, 2009).

A principal causa da anemia nesses pacientes é a menor sobrevivência das hemácias, trata-se de uma anemia hemolítica, que cursa com aumento da bilirrubina indireta, hiperplasia eritróide da medula óssea e elevação dos reticulócitos. No entanto, além da hemólise podem contribuir para a gênese da anemia ou agravamento fatores como carência de folato, insuficiência renal, crises aplásticas e esplenomegalia (Zago; Pinto, 2007).

Segundo Zago e Pinto (2007), os sintomas e conseqüências da anemia fazem parte da evolução da doença, podendo ser associadas com o retardo da maturação sexual, com a sobrecarga e insuficiência cardíaca na terceira década de vida, além do aparecimento de úlceras de membros inferiores:

#### a) Úlceras de Membros Inferiores

As Úlceras de Membros Inferiores (UMIs) são manifestações clínicas da anemia falciforme relativamente comuns, sendo consideradas um importante fator contribuinte para o aumento da morbidade. São complicações fisicamente incapacitantes com conseqüências psicológicas e sociais negativas para os

acometidos (Paladino, 2007; Cumming 2008; Hakabi-Tauwil 2008; Martí-Carvajal: Knight-Madden; Martinez-Zapata, 2012). Além disso, tem sido descritas desde 1910 os primeiros quatro casos relatados de anemia falciforme na América do Norte (Diggs, 1934; King, 1936; Netherton, 1936; Schwartz, 1938), porém não reconhecidas até então como complicações específicas da doença. Somente em 1939, Cummer e La Rocco sugeriram uma relação causal para esta complicação (Herrick, 2001).

As UMIs acometem 8% a 10% dos pacientes homozigotos, com incidência superior a 50% em pacientes que residem em áreas tropicais, mostrando variabilidade fenotípica em função de fatores genéticos e ambientais (Trent; Kirsner, 2004; Kosy *et al.*, 2005; Paladino, 2007; Perrine *et al.*, 2010).

Em pesquisas realizadas no Brasil com portadores de hemoglobinopatias, a prevalência de UMIs associadas à doença falciforme foi de 20% e na anemia falciforme correspondeu a 22% (Meneses *et al.*, 2010). Segundo Rocha, (2004) no Rio de Janeiro, esse percentual foi de 35%.

Dados provenientes da Jamaica indicam que as UMIs são raras antes dos 10 anos de idade, ocorrendo mais frequentemente entre os 10 e 25 anos, se tornam cada vez mais raras após os 30 anos e acometem o sexo masculino na proporção de 3:1. Um padrão similar foi verificado em um estudo multicêntrico sobre doença falciforme realizado nos Estados Unidos, embora a máxima incidência tenha ocorrido um pouco mais tarde entre os 20 e 50 anos de idade (Koshy *et al.*, 1989).

As UMIs nos acometidos pela doença falciforme podem ser únicas ou múltiplas e são normalmente dolorosas. Ocorrem em área com menos tecido subcutâneo e pele fina, como a região maleolar externa, tibial anterior, área do tendão de Aquiles e, em menor número, no dorso do pé. O aparecimento é espontâneo ou em consequência de pequenos traumas apresenta alta recorrência, cicatrização lenta e pior resposta ao tratamento que úlceras de outra etiologia (Trent e Kirsner, 2004).

De acordo com a duração do processo de reparação tissular, as UMIs podem ser classificadas em agudas ou crônicas, no entanto, não existe consenso quanto a um período de tempo específico para definir a cronicidade. Uma úlcera aguda geralmente deve cicatrizar em menos de um mês. Entre

úlceras crônicas, uma duração de seis meses, parece definir as úlceras mais recalcitrantes. Não é incomum para úlceras durar muitos anos, muitas vezes fechando e reabrindo várias vezes (Paladino, 2007; Minniti *et al.*, 2010; Perrine *et al.*, 2010).

#### a. Etiologia das Úlceras de Membros Inferiores

A causa exata das UMIs em pacientes falciformes permanece obscura. Entretanto, há consenso de que se trata de um problema com múltiplas origens e a literatura tem catalogado diversos fatores de risco que convergem para a instalação e manutenção da doença, sendo que o estresse fisiológico crônico induzido pelo impedimento da microcirculação parece desempenhar papel importante no processo (Ladizinski *et al.*, 2012; Bowers *et al.*, 2013).

Estima-se que em 90% dos casos o evento inicial é de origem traumática, por prurido local (4%), secundária a picada de insetos (6%) ou de origem espontânea em decorrência de hipóxia tecidual por crises vaso-oclusivas de repetição. A deficiência de antitrombina III foi também implicada na patogênese da úlcera em pacientes falciformes por promover oclusão venosa (Morelli, 2004; Meneses *et al.*, 2010).

A incidência de úlcera é menor em pacientes que apresentam níveis elevados de HbF e hemoglobina basal, uma vez que níveis mais baixos de HbF estão relacionados a uma anemia mais intensa, o que agrava a hipóxia tecidual. Um estudo americano apontou que 43,2% dos pacientes que apresentavam UMIs possuíam níveis de hemoglobina basal inferiores a 6 g/dL. Este estudo também mostrou o efeito protetor dos altos níveis de HbF, com incidência de 0,7% em pacientes com concentração de HbF superior a 10% (Serjeant *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a presença de polimorfismos genéticos pode modular os subfenótipos da doença falciforme, levando a várias complicações, incluindo a úlcera. Os genes como HLA-B35 e Cw4 foram relatados nestes pacientes e tem sido estudada a possível participação desses genes reguladores da enzima óxido nítrico sintetase, uma vez que o produto desta enzima, óxido nítrico, que é vasodilatador e inibidor de adesão plaquetária, pode ser inativado

pela hemoglobina livre no plasma, em decorrência da hemólise intravascular (Paladino, 2007).

A hipertensão e a insuficiência venosa de membros inferiores são outros fatores apontados, mas seu papel na patogênese e persistência das UMIs permanece inconclusivo (Wang, 2004).

#### b. Fisiopatologia das Úlceras de Membros Inferiores

Inicialmente pequenas lesões nos membros inferiores podem demorar a cicatrizar, dando origem a úlceras maiores cuja cura pode demorar anos. Naquelas de origem espontânea, a lesão se desenvolve na derme circundada por região de endurecimento e hiperpigmentação. As lesões podem ser, em primeiro momento, recobertas pela epiderme intacta que, após ser degradada, dão origem a feridas pequenas, profundas e dolorosas com destruição do tecido subcutâneo e dos folículos pilosos, gerando dermatoesclerose perilesional. Em decorrência da capacidade de cura comprometida, dá-se a persistência e agravamento da úlcera (Rocha, 2004).

As taxas de cicatrização verificadas em pacientes falciformes são de 3,3 a 8,1 mm<sup>2</sup>/dia, sendo consideradas muito baixas quando comparadas com as úlceras de membros inferiores de outras etiologias (400mm<sup>2</sup>/dia) e, mesmo após uma cicatrização satisfatória, há recorrência de 25% a 52% dos casos (Serjeant *et al.*, 2005).

As UMIs ocorrem mais comumente no terço inferior da perna e com menor frequência sobre e ao redor do maléolo medial ou lateral. Apresenta ainda predomínio do lado esquerdo sobre o direito da ordem de 3:2, possivelmente por drenagem venosa dificultada através da íliaca esquerda comum, mais longa e oblíqua que a direita (Serjeant; Serjeant: Mohan, 2005; Minniti *et al.*, 2010).

As lesões variam em média de 0,5 cm até 15 cm de diâmetro, embora tenham sido relatados casos cuja área comprometida ocupa toda a extensão de pele entre o tornozelo e o joelho (Serjeant *et al.*, 2005).

No Brasil, as úlceras dos portadores de anemia falciforme costumam ser relatadas acima dos maléolos, entre os dedos dos pés e na parte posterior da

panturrilha (Rocha, 2004). Apresentam margens definidas com bordas ligeiramente elevadas com assoalho consistindo em tecido granuloso frequentemente recoberto por secreção amarelada. À microscopia óptica, verifica-se epiderme hiperplásica, derme constituída por colágeno bastante celuloso, neoformação vascular em torno das arteríolas ocluídas, presença de hemácias em foice e infiltrado inflamatório linfocitário (Menezes *et al.*, 2010).

A cicatrização das lesões crônicas ainda é um grande desafio para os profissionais de saúde, que buscam uma aceleração deste processo. Os micro-organismos estão presentes em todas as feridas crônicas e o seu papel em infecções depende de sua concentração, espécie e resposta imune do hospedeiro (Vincentim *et al.*, 2008).

## 2.2. MICROBIOLOGIA DAS ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES

As UMIs geralmente são contaminadas e até colonizadas por uma variedade de micro-organismos endógenos, especialmente os de origem fecal, oral e cutâneo. Este fato é considerado normal e não é tido como fator inibidor da dinâmica de cicatrização ou mesmo infecção. Na verdade, sobre determinadas circunstâncias, a colonização das lesões por micro-organismos provenientes da microbiota normal parece promover a cicatrização (Howell-Jones *et al.*, 2005).

Em geral há dificuldades para se determinar se a úlcera está de fato infectada ou apenas colonizada. O número aumentado de bactérias na superfície da úlcera significa que há colonização e não necessariamente infecção. Ainda assim, é necessário considerar que historicamente estudos demonstraram forte relação entre a elevada quantidade de bactérias presentes em ulcerações e o retardo no processo cicatricial (Mertz; Eaglestein, 1984; Dagher *et al.*, 1987).

Os micro-organismos associados às lesões de membros inferiores frequentemente fazem parte da microbiota da pele, comumente ocorrendo infecções mistas. Observa-se ainda que as condições de calor, umidade e má higiene que acometem grande parte da população tropical, acrescidas da

proximidade entre as UMIs e o solo, favorecem a colonização por bactérias diversas daquelas da microbiota da pele (Fernandes *et al.*, 2007).

A transição da colonização para infecção é verificada clinicamente por meio de sintomas como secreções purulentas, inflamação, e, para lesões crônicas, cura mais lenta, tecido de granulação friável e descolorido, odor fétido e necrose. Um dos fatores determinantes para que ocorra a infecção é o desequilíbrio da interação com o hospedeiro em favor do micro-organismo (Gardner *et al.*, 2001; Vincentim *et al.*, 2009).

Macedo *et al.* (2003), em estudo envolvendo pacientes portadores de úlceras leishmanióticas, observaram com base em sinais inflamatórios perilesionais, que a ocorrência de infecções bacterianas secundárias é rara. Assim, os autores sugerem que as bactérias parecem agir como micro-organismos colonizantes, assumindo papel importante no aparecimento da infecção na ferida e da sepse em pacientes imunocometidos.

Embora a natureza polimicrobiana das infecções das úlceras de membros inferiores envolva tanto micro-organismos aeróbios quanto anaeróbios, a cicatrização retardada tem mais frequentemente sido associada com patógenos aeróbicos ou facultativos. Assim, para antecipar e combater estas infecções, a microbiologia clínica tem concentrado esforços na determinação de concentrações e identidades dos patógenos existentes nas úlceras (Bowler; Davies, 1999; Frank *et al.*, 2009).

Em úlceras de pé em pacientes diabéticos os micro-organismos *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., espécies de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. são os aeróbios mais comumente isolados (Minaric-Missoni *et al.*, 2005).

Um perfil de micro-organismos semelhante foi isolado de material obtido de 30 pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, destacando-se como mais frequentes as espécies Gram-positivas, *S. aureus* e *S. saprophyticus* e Gram-negativas, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Gonçalves *et al.*, 2009). Entretanto, a magnitude das infecções fúngicas neste grupo de indivíduos é uma área que tem recebido pouca atenção. Foi demonstrado que infecções por dermatófitos fornecem um microambiente adequado para subsequente colonização por bactérias. Além disso, infecções

fúngicas induzem dano ao estrato córneo, que permite a proliferação das bactérias residentes (Chellan *et al.*, 2010).

Os poucos dados existentes sobre a frequência de isolados fúngicos em UMIs apresentam o gênero *Candida* como o micro-organismo mais frequente, ocorrendo em até 21% dos casos. As espécies predominantes são *C. parapsilosis* (45,5%), *C. tropicalis* (22,7%), *C. albicans* (9,1%) e *C. glabrata* (9,1%) (Minaric-Missoni *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por Bansal *et al.* (2008) em 103 pacientes diabéticos, apresentando úlceras de pé as espécies predominantes foram *C. tropicalis* (29%), *C. albicans* (14%) e *C. guilliermondii* (7%), seguidos por *Aspegillus flavus* (21%), *A. niger* (14%) e espécies de *Fusarium* (14%).

A alta prevalência de infecções fúngicas em tecidos profundos provenientes de úlceras de membros inferiores em pacientes diabéticos também tem sido relatada por Chellan *et al.* (2010).

O gênero *Candida*, descrito por Berckhout em 1923, congrega espécies que podem fazer parte da pele e mucosa de humanos que podem, em determinadas circunstâncias, portar-se como patogênicas. Espécies de *Candida* consideradas patógenas oportunistas apresentaram um aumento significativo na última década como agentes de infecções graves e disseminadas, com sérias consequências (Kumar *et al.*, 2009).

Além disso, a candidemia se destaca entre as infecções fúngicas invasivas, com taxa de mortalidade de 61% no Brasil. O seu desenvolvimento está associado a diversas condições, dentre elas a colonização por *Candida*, fato que reforça a necessidade de atenção quanto à presença deste micro-organismo nas UMIs (Lyon *et al.*, 2010; Kriengkauykiat; Ito; Dadwal, 2011; Santos *et al.*, 2014).

É importante considerar ainda que nas últimas décadas, bacteriologistas e, mais recentemente, micologistas têm observado que os micro-organismos praticamente não existem na sua forma livre, planctônica, mas se agrupam formando estruturas biológicas com elevado grau de organização, formando comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais: os biofilmes (Douglas, 2004; Soll, 2008; Ramage *et al.*, 2009; Giolo e Svidzinski, 2010). Estas estruturas representam o mais prevalente tipo de crescimento microbiano na

natureza e são importantes para o desenvolvimento de infecções fúngicas, estando relacionados com alto nível de resistência aos antifúngicos e as defesas do hospedeiro (Madigan *et al.*, 2010; Tobudic *et al.*, 2012).

### 2.1.6 Formação de biofilme

Os biofilmes podem se desenvolver em qualquer superfície úmida, seja ela biótica ou abiótica, como pele, mucosas, dentes, cateteres, próteses, válvulas, sistemas de tubulação de água potável, ambientes industriais e sistemas aquáticos naturais (Kojic; Darouiche, 2004; Mohammed; Douglas, 2006; Brooks; Jefferson, 2012).

Para que ocorra a transição da forma de desenvolvimento de células livres para a forma de biofilme, os micro-organismos passam por profundas mudanças, em resposta a uma variedade de condições, incluindo alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental. Estudos genéticos e moleculares identificaram genes e circuitos regulatórios responsáveis pela interação inicial célula-superfície, maturação do biofilme e retorno dos micro-organismos do biofilme à forma de células livres (O' Toole *et al.*, 2000).

Anteriormente, os biofilmes bacterianos eram considerados de maior importância, entretanto os biofilmes produzidos por fungos tem se destacado devido à capacidade patogênica, consistindo em uma mistura de células do hospedeiro, uma densa rede de leveduras, hifas e pseudohifas imersos em uma matriz extracelular de natureza predominantemente polissacarídica (Chandra *et al.*, 2001; Andes *et al.*, 2004; Alem; Douglas, 2005; Ramage *et al.*, 2005).

Apesar de gêneros fúngicos como *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Fusarium* e *Pneumocystis* terem sido relatadas como sendo produtoras de biofilmes (Donlan; Costerton, 2002; Net; Andes, 2006; Pemán; Cantón; Valentín, 2008; Chandrasekar; Manavathu, 2008; Cushion; Collins; Cinke, 2009), espécies de *Candida*, especialmente *C. albicans*, são as mais comumente associadas com infecções relacionadas a estas estruturas. As leveduras pertencentes às espécies de *Candida* diferem na capacidade de formar biofilmes, que variam na

sua morfologia, composição das substâncias poliméricas extracelulares e resistência antifúngica (Seneviratne *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2009). Alguns trabalhos também afirmam que diferentes cepas de uma mesma espécie podem apresentar diferenças na sua capacidade de formar estes agregados celulares, indicando que estirpes formadoras de biofilmes “fortes” e “fracos” podem existir dentro de uma mesma espécie (Jin *et al.*, 2003; Thein *et al.*, 2007).

Ainda, além da *C. albicans*, outras espécies do gênero também são relacionadas com a formação do biofilme, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. pulcherrima*, *C. sake* e *C. pseudotropicalis* (Bezerra *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Gasparoto *et al.*, 2009; Marcos-Arias *et al.*, 2009; Zomorandian *et al.*, 2011).

A formação de biofilme por *C. albicans* tem sido caracterizada *in vitro* e *in vivo* por diversas pesquisas (Chandra *et al.*, 2001; Andes *et al.* 2004; Ricicova *et al.* 2010). Dessa forma, tem sido subdividido em quatro estágios: aderência mediada por proteínas da parede celular da levedura a superfícies, crescimento das leveduras unidas em uma fina camada celular, maturação do biofilme por meio do desenvolvimento de pseudo-hifas e hifas e secreção de substâncias poliméricas extracelulares e dispersão das leveduras do biofilme, possivelmente levando a colonização de locais distantes (Blankenship; Mitchell, 2006; Kaneko *et al.*, 2013; Uppuluri *et al.*, 2010; Mathe e Van Dijck, 2013).

Em um estudo sobre o desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*, Baillie e Douglas (1999) mostraram o importante papel da transição da fase de levedura para a fase hifal. Os autores observaram que a camada do biofilme mais próxima da superfície é composta principalmente por células de leveduras. Cepas incapazes de formar hifas produzem um biofilme mais delgado de células de levedura no substrato, sendo parte mais externa composta por uma camada de hifas. As cepas incapazes de formar leveduras ainda poderiam aderir à superfície e gerar estrutura semelhante à camada superior do biofilme do tipo selvagem, com a ressalva de que esta comunidade foi mais fácil de remover da superfície. Ainda, foi concluído que a superfície a qual a levedura adere pode influenciar na estrutura final do biofilme.

Jin *et al.* (2003) verificaram que estirpes selvagens de *Candida* demonstraram possuir maior capacidade de formar biofilmes quando comparadas com cepas laboratoriais de referência. Alguns trabalhos afirmam que *C. albicans* e *C. krusei* formam biofilmes mais confluentes do que outras espécies de *Candida* (Samaranayake *et al.*, 2005; Parahitiyawa *et al.*, 2006).

Biofilmes podem ser formados com uma única espécie ou com múltiplas espécies de micro-organismos. Prevalece na maioria dos ambientes o biofilme de múltiplas espécies, mas o biofilme de única espécie desempenha um importante papel em uma variedade de infecções e na superfície de implantes médicos (Adal e Farr, 1996; Archibald e Gaynes, 1997). Segundo Yang (2003) existe uma associação positiva entre o grau de virulência e a habilidade para formar biofilmes.

Ainda sobre esta estrutura, sabe-se que biofilmes microbianos estão implicados tanto em feridas agudas de pele como crônicas, comprometendo a cicatrização e cura dessas lesões. Estudos demonstram que o biofilme reside na ferida crônica e isto representa um importante mecanismo que retarda a cicatrização e propicia a continuidade da infecção (Campos *et al.*, 2008; Quindós, Villar-Vidal; Eraso, 2009; Percival *et al.*, 2012). Contudo, até então, não há na literatura relato de produção de biofilme por fungos que estejam presentes em UMIs.

Rmage, Lopez-Ribot (2005) afirmam que a maioria das doenças causadas por *C. albicans* são associadas ao crescimento de biofilme. No entanto, em estudo desenvolvido por Gasparetto e colaboradores (2005), de um total de 92 leveduras avaliadas, 63% foram capazes de produzir biofilme, sendo verificado que, proporcionalmente, as espécies *Candida* não-*albicans* foram mais aderentes ao substrato. A capacidade de formação de biofilme também foi apontada em outro trabalho como sendo maior em espécies *Candida* não-*albicans* do que em *C. albicans* (Kumar; Menon, 2006).

Cendejas-Bueno *et al.* (2012) avaliaram a capacidade de formação de biofilme por isolados clínico do complexo *C. haemulonii* provenientes de diversas origens e verificaram que as espécies do referido complexo não formam biofilmes bem desenvolvidos em meio YNB suplementado com 50 Mm de glicose.

A habilidade de formar biofilme está intimamente associada à capacidade de causar infecções, sendo considerada um importante fator de virulência. Além disso, os biofilmes formados por micro-organismos presentes em feridas crônicas são altamente adaptáveis a ecologias complexas, representando um desafio terapêutico, por comprometer a cicatrização da ferida, aumentar o risco de infecção e promover mecanismos de resistência contra o sistema imune do hospedeiro e antifúngicos (Smith *et al.*, 2010; Romanelli *et al.*, 2010; Beele *et al.*, 2010).

### **2.1.7 Susceptibilidade antifúngica *in vitro***

Testes de susceptibilidade antifúngica são métodos confiáveis, reprodutíveis e imprescindíveis para realização de terapêutica eficaz, a qual depende da correta escolha do fármaco que apresente atividade em relação ao fungo em questão (Barros, Santos, Hamdan, 2006). Os métodos padronizados de reconhecimento nacional e internacional para leveduras e fungos filamentosos têm contribuído para predizer não somente o tipo de antifúngico adequado, como também a concentração do fármaco para a terapêutica instituída (Rex *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 2008; Kuper *et al.*, 2012; Pfaller, 2012).

Inicialmente, para leveduras, foi proposto o documento M27-A em 1997, com segunda edição aprovada em 2002 (M27-A2), terceira edição em 2008 (M27-A3), atualizado com os novos *breakpoints*, chamados “espécie-específicos” publicados em 2012 (M27-S4), todos pertencentes ao Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Cuenca-Estrella *et al.*, 2002). O documento é composto por protocolo padronizado para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de leveduras que causam infecções invasivas.

O documento inclui a seleção de agentes antifúngicos, preparação de soluções-padrão e diluições de antifúngicos utilizadas para realização, implementação e interpretação dos testes. Além disso, esta padronização está relacionada com os meios de cultura utilizados para crescimento do fungo e para o teste de susceptibilidade (RPMI-1640), determinação da concentração

inibitória mínima (CIM), padronização do inóculo, temperatura de incubação, leitura e interpretação dos resultados (CLSI, 2008; CLSI, 2012).

No entanto, permanece como desafio a interpretação dos resultados nos testes *in vitro* de susceptibilidade aos antifúngicos, pois os valores de CIM nem sempre estão diretamente associados com a resposta antifúngica *in vivo*. Este fato se observa porque a resposta clínica depende de fatores intrínsecos ao antifúngico e da interação entre o patógeno e o hospedeiro. Os autores afirmam ainda que pode haver diferenças entre resultados de sensibilidade *in vitro* e *in vivo* (Rivas; Serrano, 2003).

Outrossim, apesar de haver disponíveis no mercado agentes antifúngicos, mais ativos e menos tóxicos além do uso de profilaxia antifúngica, a candidíase invasiva continua sendo associada a altas taxas de mortalidade (Kriengkauykiat; Ito; Dadwal, 2011). Neste contexto, a resistência antifúngica permanece crescente, conduzindo a falha terapêutica e conseqüentemente dificuldade no combate a infecções invasivas por espécies de *Candida*. A resistência clínica frequentemente está associada a concentrações inibitórias mínimas (CIMs) elevadas, sendo as principais causas de esquema terapêutico ineficaz a utilização de doses inadequadas, interações medicamentosas e neutropenia grave (Lim *et al.*, 2012).

De maneira semelhante aos fenômenos de resistência, que são observados quando se utiliza agentes antibacterianos, a resistência aos antifúngicos pode ser inata ou secundária aos antimicóticos que são administrados (Santos, 2014). A sensibilidade às drogas antifúngicas varia entre as diferentes espécies de *Candida*. Este fato realça a importância em se identificar as espécies, bem como em se determinar as CIMs dos antifúngicos para que dessa forma, seja possível evitar o aparecimento de cepas resistentes e se realizar conduta terapêutica adequada (Germain *et al.*, 2001; Santos 2014).

As drogas mais utilizadas para o tratamento de candidíase são pertencentes a quatro diferentes classes: poliênicos, incluindo anfotericina B, os azóis como o fluconazol e o voriconazol, as pirimidinas e as equinocandinas (Pappas *et al.*, 2009). O desenvolvimento de uma nova geração de azóis e equinocandinas tem aumentado as opções terapêuticas para o tratamento (Chapman, 2007).

A utilização da ciclopirox olamina no tratamento tem sido sugerida em infecções por *Candida* e, Segundo Niewerth *et al.* (2003) e Walsh *et al.* (2006), este fármaco é um agente fungicida com amplo espectro de ação antimicrobiana e anti-inflamatória, demonstrando excelente atividade fungicida contra fungos de interesse médico como dermatófitos e leveduras, incluindo aquelas frequentemente azol-resistentes como *Candida glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Também, o fármaco apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Weir *et al.*, 2011).

#### a) Polienos

O mecanismo de ação dos polienos é baseado na interação específica com o ergosterol, esteróide constituinte exclusivo da membrana celular fúngica, conduzindo à formação de poros através de membranas lipídicas, com alteração da permeabilidade celular que permite, portanto, o escape de íons e metabólitos, principalmente íons de potássio ocasionando a morte celular (Odds *et al.*, 2003).

O espectro de ação *in vitro* desta classe de antifúngicos abrange leveduras, fungos dimórficos e a maioria dos fungos filamentosos oportunistas, sobre os quais exerce um efeito fungistático ou fungicida (Odds *et al.*, 2003; Wingard e Leather, 2004). Dentre os antifúngicos poliênicos apenas a anfotericina B com suas diferentes formulações é usada para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Paramythiotou *et al.*, 2014).

A anfotericina B é produzida naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*, e foi inicialmente isolada em meados de 1955 (Gold *et al.*, 1956), desde então, apenas alguns agentes com ação antifúngica descobertos tornaram-se viáveis para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. Apesar da sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980, a potência, o espectro de ação e os quase 50 anos de uso clínico têm assegurado que este antifúngico permaneça como fármaco de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas (Dismukes, 2000). Contudo, o uso deve ser limitado devido a problemas de tolerabilidade, salientando-se a nefrotoxicidade e as reações ligadas à infusão.

Devido à semelhança das moléculas de ergosterol da parede celular fúngica e de colesterol da membrana celular dos mamíferos, a anfotericina B liga-se também ao colesterol, causando alterações na molécula e provocando grande parte dos efeitos adversos. A emergência de resistências a este fármaco também começa a ter relevância clínica. Visando à diminuição da toxicidade deste antifúngico têm sido desenvolvidas formulações lipossomais, porém o custo destas é elevado e a penetração renal pode ser menor (Zaoutiz *et al.*, 2005).

A anfotericina B desoxicolato (convencional ou Amb) teve aprovação para uso em adultos em 1958, e agora também vem sendo indicada para administração em crianças. É pouco absorvida após a administração oral, porém quando em via intravenosa é amplamente distribuída no corpo e pode ser detectada no fígado, baço e rins. Este fármaco tem uma meia-vida mais longa (15 horas) e maior potencial de acumulação em lactentes do que em adultos (Testoni; Smith; Benjamin, 2012).

A resistência à anfotericina B é incomum, entretanto tem sido reportada frequentemente resistência por isolados de *C. lusitaniae*, e ocasionalmente por *C. parapsilosis* (Chapman, 2007).

Em um estudo utilizando-se cepas isoladas de pacientes hospitalizados em todo o continente americano, *C. albicans* foi a espécie mais suscetível à Amb, verificado pela concentração mínima de 90% de inibição (CIM<sub>90</sub>) de 1,0 mg/mL, seguida de cepas resistentes de *C. glabrata* (CIM<sub>90</sub> 4,0 mg/mL), *C. parapsilosis* (CIM<sub>90</sub> 4,0 mg/mL) e *C. krusei* (CIM<sub>90</sub> 8,0 mg/mL) (Pfaller *et al.*, 2002).

No Rio Grande do Sul, Antunes e colaboradores (2004) avaliaram a suscetibilidade de 120 isolados oriundos de candidemia utilizando procedimentos padronizados pelo CLSI (M27-A2). Todos os isolados evidenciaram quanto à anfotericina B convencional CIMs < 1µg/mL, os quais foram considerados sensíveis. Colombo *et al.* (2006) em estudo multicêntrico sobre candidemias, envolvendo 11 centros médicos do Brasil, avaliaram 712 isolados frente à anfotericina B e não detectaram nenhum achado de resistência.

## b) Azólicos

Os antifúngicos azólicos sistêmicos foram introduzidos no mercado na década de 80 como drogas alternativas para o tratamento das micoses invasivas, principalmente em indivíduos debilitados, cujo tratamento com anfotericina B não era possível devido a elevada toxicidade (Akins, 2005). Esses antifúngicos apresentam ação fungistática atuando na inibição do crescimento celular (Chapman, 2007).

Os azóis são caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, o qual contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). O mecanismo de ação está associado a inibição do citocromo P450 fúngico, através da desmetilação do 14-alfa-lanosterol, com conseqüente diminuição do ergosterol celular. Com a depleção do ergosterol, a integridade da membrana celular fúngica fica comprometida (Margotto, 2012).

No tratamento de doenças fúngicas invasivas estão disponíveis cinco compostos azólicos incluindo itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravonazol e posaconazol. Para o tratamento de candidiases superficiais se destaca o cetoconazol (Paramythiotou *et al.*, 2014).

O fluconazol é um antifúngico pertencente a família dos triazóis de primeira geração, o qual age através da inibição da enzima 14- $\alpha$ -esterol demetilase, necessária para a produção de ergosterol, um componente importante da membrana celular fúngica. É importante ressaltar que os azóis são fungistáticos, inibindo o crescimento celular, mas não são fungicidas (Chapman, 2007).

Vários estudos randomizados relatam que o uso profilático de fluconazol diminuiu a incidência de doença invasiva (Parikh *et al.*, 2007; Weitkamp *et al.*, 2008; Aydemir *et al.*, 2011). Embora a profilaxia com este fármaco diminua a ocorrência de candidíase invasiva em populações de alto risco, não se sabe se reduz a mortalidade em geral ou quais efeitos no neurodesenvolvimento podem estar associados em longo prazo. Existe também preocupação de que este procedimento possa aumentar a incidência de cepas resistentes (Manzoni *et al.*, 2008).

Em relação ao uso do fluconazol uma preocupação é o surgimento de resistência, principalmente entre as espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. krusei* e *C. glabrata* (Sabatelli *et al.*, 2006), sendo também relatada em menor proporção a ocorrência de resistência em isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Chapman, 2007).

Pfaller *et al.* (2005) em um estudo mundial de 6,5 anos verificaram dentre os isolados testados que a atividade de fluconazol permanece elevada contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, apesar de ter sido observada resistência considerável entre isolados de *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Nos últimos anos no EUA, Europa e América do Sul a resistência aos azólicos tem aumentado, em particular ao fluconazol. Até 2005 raramente resistência a este fármaco era relatada (Pfaller; Diekema, 2007), mas dados a partir da segunda metade da década mostram um aumento significativo na resistência, sobretudo, de isolados nosocomiais (Pfaller *et al.*, 2011).

Em estudo conduzido por Mímica *et al.* (2009) foram avaliados 100 isolados clínicos de *Candida* sp. provenientes de um hospital da cidade de São Paulo. Entre os azólicos, o fluconazol foi o antifúngico com maior espectro de ação; apenas as cepas de *C. krusei*, intrinsecamente resistentes à ação desse antifúngico, não apresentaram sensibilidade.

O voriconazol pertence à segunda geração dos triazóis que foi desenvolvida com o objetivo de ampliar o espectro de atividade deste grupo de fármacos. Possui elevada biodisponibilidade oral (90%) e uma meia-vida de seis horas (Pfaller *et al.*, 2002), apresentando como efeitos adversos em todas as faixas etárias: distúrbios visuais transitórios e fotossensibilidade; elevação transitória leve dos níveis das enzimas hepáticas também foi observada (Walsh *et al.*, 2010; Shima *et al.*, 2010).

Este fármaco mostra-se eficaz sobre muitas espécies de *Candida*, incluindo *C. krusei*, *C. glabrata* e algumas estirpes resistentes ao fluconazol. Apesar da boa eficácia vários pesquisadores têm alertado em relação ao uso em pacientes expostos previamente aos azóis, devido ao potencial de resistência cruzada, especialmente com cepas de *C. glabrata* resistentes a fluconazol (Alexander *et al.*, 2005). A relevância clínica desta resistência cruzada tem sido documentada em uma série de casos. Embora a maioria dos

isolados resistentes sejam de *C. glabrata*, também foi verificada a ocorrência de resistência cruzada em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (Alexander *et al.*, 2005; Panackal *et al.*, 2006).

Os fármacos imidazólicos, como o cetoconazol, contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico, enquanto que a classe dos agentes triazólicos contém três. O mecanismo de ação está ligado à sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana das leveduras e fungos filamentosos, inibindo a síntese do ergosterol. Inibe a enzima P-450-14- $\alpha$ -demetilase dependente de lanosterol, causando acúmulo de esteróis metilados, depleção de ergosterol e inibição do crescimento celular (Rosa *et al.*, 2005).

Em relação a atividade antifúngica, o cetoconazol pode ter um efeito fungistático, mas dependendo da concentração pode ser também fungicida. É ativo *in vitro*, contra a maioria dos dermatófitos, *Candida sp*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Phialophora sp*, *Trichophyton sp*, além de agir contra *Malassezia* e *Cryptococcus neoformans* (Fuchs; Wannamacher, 2010).

Também, além dos polienos e azólicos, outra opção no tratamento de candidíase invasiva são as equinocandinas (Martinez, 2006).

### c) Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Compõem uma nova classe de antifúngicos que atuam em nível de parede celular, por inibição específica do (1,3)- $\beta$ -D-glucana sintase, complexo enzimático que forma polímeros glucano, um dos principais componentes da parede celular dos fungos. Como os mamíferos não possuem parede celular o risco de toxicidade é menor em relação aos polienos e azólicos (Odio *et al.*, 2004; Martinez, 2006).

Os antifúngicos pertencentes a esta classe possuem grande peso molecular e pouca penetração no sistema nervoso central (SNC). No entanto, estudos realizados em uma série de experiências com modelos animais, seguido por ensaios farmacocinéticos, demonstram que a micafungina e anidulafungina

podem ser utilizadas em dosagens mais elevadas para que os produtos possam alcançar com êxito as concentrações máximas para eliminação do micro-organismo dentro do SNC (Hope *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009).

Estes fármacos começaram a ser comercializadas no Brasil em 2000, com a introdução da caspofungina. Posteriormente em 2009, a anidulafungina foi introduzida como uma alternativa para o tratamento de candidíase invasiva em pacientes adultos não-neutropênicos (Bormann; Morrison, 2009). Em geral, as equinocandinas exibem uma potente atividade fungicida *in vitro* e *in vivo* contra espécies de *Candida*, incluindo patógenos resistentes aos azólicos (Chen *et al.*, 2010).

Devido ao perfil terapêutico e os níveis de segurança favoráveis, o uso de equinocandinas em pacientes críticos tem exibido um rápido aumento e existem diretrizes para administração destes medicamentos como tratamento primário para candidíase invasiva. No entanto, este recente aumento do uso de equinocandinas tem suscitado questionamentos sobre o surgimento de resistência, mas até o presente momento este fenômeno continua raro. Estudos mostram uma menor susceptibilidade a estes fármacos por algumas espécies de *Candida*, a exemplo de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Bal, 2010; Walker *et al.*, 2010). Em relação ao tratamento, outra preocupação é o elevado custo (Glockner, 2011).

A caspofungina é um derivado semissintético da pneumocandina B, produto natural de *Glarea lozoyensis*. Tem atividade contra *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. e seu uso é aprovado pela FDA para adultos e crianças acima de três meses de idade. É um antifúngico que passa por metabolismo hepático e possui meia-vida de 9-10 horas, portanto em pacientes com insuficiência renal não é necessário ajuste de dose, no entanto, a diminuição da dosagem diária é necessária em pacientes com insuficiência hepática (Arathoon *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2002, Martinez, 2006).

A micafungina apresenta atividade de amplo espectro contra patógenos clinicamente importantes, inclusive contra de *C. albicans* resistentes aos azólicos. Possui ação fungicida frente a outras espécies de *Candida* e fungistática contra espécies de *Aspergillus* (Hatano *et al.*, 2002).

A forma intravenosa é a única via de administração e nos Estados Unidos o seu uso é aprovado tanto para adultos quanto crianças e neonatos. Tem uma meia-vida de aproximadamente 12 horas em adultos e as maiores concentrações da droga são detectadas nos pulmões, fígado, baço e rins. É metabolizada principalmente no fígado e poucas interações medicamentosas são descritas. A excreção fecal é a principal via de eliminação (Infante-Lopez e Rojo-Conejo, 2009; Yamada *et al.*, 2011).

Ghannoum *et al.* (2009) evidenciaram que a caspofungina e micafungina se comportam de forma similar entre si; porém, diferentemente das demais, a anidulafungina possui uma cadeia lateral substituída por outra de origem sintética a qual potencializou a atividade antifúngica, sendo raros os casos de resistência a essa droga. Adicionalmente, a anidulafungina é a única equinocandina que não sofre metabolismo hepático, sendo lentamente degradada no plasma humano; não sendo, portanto, necessário o ajuste da dosagem para prevenir insuficiência renal ou hepática (Cohen-Wolkowicz *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2010).

Pfaller *et al.* em 2005 avaliaram 2.500 isolados de *Candida* frente à anidulafungina, que se mostrou muito eficaz contra as espécies deste gênero. As espécies mais susceptíveis foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. kefyr*, enquanto as que apresentaram menor sensibilidade foram *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, e *C. guilliermondii*. Em um estudo conduzido por Reboli *et al.* (2007) anidulafungina mostrou eficácia de 15,4% maior contra espécies de *Candida* do que o fluconazol.

#### d) Ciclopirox olamina

De acordo com Jones (2003) os ensaios clínicos com ciclopirox olamina iniciaram em 1980 e permanecem em desenvolvimento. Atualmente, pesquisas com o fármaco estão concentradas no tratamento de infecções fúngicas da pele e candidíase vaginal, onde está bem estabelecido nestas indicações.

Segundo Niewerth *et al.* (2003); Walsh *et al.* (2006), este fármaco é um agente fungicida com amplo espectro de ação antimicrobiana e anti-inflamatória, demonstrando excelente atividade fungicida contra fungos de

interesse médico como dermatófitos e leveduras, incluindo aquelas frequentemente azol-resistentes como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Além disso, o fármaco também apresenta amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de atuar em tumores malignos de origem hematológica (Weir *et al.*, 2011).

Gupta (2001) e Gupta; Plott (2004) afirmam que a atividade antiinflamatória inerente a ciclopirox olamina representa um fator importante nas infecções fúngicas, uma vez que estas podem ser complicadas na presença de processos inflamatórios.

Ciclopirox olamina pode ser fungistático ou fungicida e dentre as espécies de dermatófitos que são inibidas pelo ciclopirox, destacam-se *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Entre as leveduras, destacam-se espécies de *Malassezia* como *M. restricta*, *M. globosa* e *M. furfur* e espécies de *Candida* como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Além destes, pode atuar também contra fungos dimórficos (*Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum*), e vários outros, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phialophora* e *Fusarium*. (Niewerth *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

Desde que ciclopirox foi introduzido na terapêutica clínica, há mais de 20 anos, vários estudos enfocando o mecanismo de ação do fármaco foram publicados. Segundo Gupta (2001), quando sua utilização tornou-se mais frequente, os resultados de várias investigações e comparações da sua eficácia com outros agentes antimicrobianos foram relatados.

Iwata; Yamaguchi (1981); Urbani *et al.* (1995), Gupta (2001) e Jones (2003) descreveram que diferentemente da maioria dos agentes antifúngicos, ciclopirox olamina não exerce efeitos sobre a biossíntese do esterol e seu mecanismo de ação é complexo, interferindo em vários processos metabólicos da célula fúngica.

Pesquisas realizadas por Abrams *et al.* (1992); Gupta (2001) e Niewerth *et al.* (2003), demonstraram que o mecanismo de ação do fármaco consiste na interferência na recaptção e acumulação de precursores da síntese de macromoléculas da célula fúngica como aminoácidos ou na absorção de íons essenciais como potássio e fosfato, além de causar inibição da biossíntese de

ácido ribonucléico (RNA) e ácido desoxirribonucléico (DNA) destes micro-organismos.

Além desses mecanismos, Bohr; Kraemer (2000); Gupta (2001); Kokjohn *et al.* (2003) e Jones (2003) descrevem que ciclopirox olamina atua na quelatação de metais trivalentes como o  $\text{Fe}^{3+}$ , por quem tem alta afinidade. Este mecanismo inibe enzimas dependentes de metal como catalase e peroxidase, as quais são importantes na degradação de peróxidos tóxicos e, conseqüentemente, contribuem para a integridade da célula fúngica. Segundo Jones (2003), este mecanismo único contribui para um potencial muito baixo no desenvolvimento de mecanismos de resistência fúngica.

Com base nos estudos de Bohr; Kramer (2000), a complexidade do mecanismo de ação da ciclopirox olamina pode gerar uma diminuição na ocorrência de resistência, quando comparado a outros agentes antifúngicos. Comprovando esta afirmação, verifica-se que mesmo após ser introduzido na terapia clínica há mais de 20 anos, ainda não foi constatado resistência fúngica (Niewerth *et al.*, 2003).

Com relação à segurança do fármaco, pesquisas confirmam que os efeitos adversos são raros e limitam-se a reações locais após aplicação tópica. A toxicidade do fármaco foi testada em vários modelos animais, assim como a sua carcinogenicidade e mutagenicidade, para os quais não foi demonstrada potencialidade em nenhum dos efeitos testados. Contudo, ciclopirox olamina apresenta baixa biodisponibilidade e tempo de meia vida curto, o que justifica a importância da nanotecnologia terapêutica para superar as desvantagens do fármaco e, ao mesmo tempo, possibilitar a sua aplicação *in vivo* (Alpermann; Schutz, 1981; Coppi; Silingardi, 1992; Gupta; Skinner, 2003).

A interação entre patógeno e hospederio é fator determinante para que a susceptibilidade observada *in vitro* se converta em sucesso terapêutico. Assim, dentre os fatores intrínsecos do infectado, tem tido papel de destaque na literatura a lectina ligadora de manose (MBL). Trata-se de uma proteína plasmática que participa do sistema de defesa inato neutralizando microrganismos patogênicos. Polimorfismos na região promotora e no éxon 1 do gene *MBL2* estão associados a baixos níveis séricos da proteína funcional,

com influência na susceptibilidade a uma variedade de processos infecciosos (Gulla *et al.*, 2009).

## 2.2 LECTINA LIGADORA DE MANOSE

A existência de proteínas capazes de se ligar a carboidratos foi inicialmente descrita por Robinson *et al* (1975), no soro de mamíferos. Estas proteínas, denominadas lectinas, foram isoladas pela primeira vez em 1978 a partir de frações citosólicas do fígado de coelhos (Fujita, 2002). Posteriormente Wild *et al.* (1983) foram capazes de isolar a chamada Lectina Ligadora de Manose (MBL) em fígado de humanos e de ratos. Também, a transcrição extra-hepática de MBL foi relatada, podendo ter esse fator implicações sobre o papel na defesa localizada do hospedeiro (Dommett *et al.*, 2006; Seyfarth *et al.*, 2006).

A MBL é um importante componente do sistema imune inato, pertence a uma família de proteínas designadas colectinas, devido à presença de uma região de colágeno e um domínio de lectina. Trata-se de uma proteína sintetizada pelo fígado, e embora circule predominantemente no soro, também tem sido encontrada em vários sítios, como no fluído do ouvido médio, líquido amniótico e secreção nasofaríngea (Malhotra *et al.*, 1994). Tal proteína é capaz de reconhecer e se ligar a superfície de carboidratos em uma ampla gama de agentes patogênicos, incluindo bactérias, vírus e fungos, ativando o sistema complemento (Turner, 2004; Carvalho, 2006).

O sistema complemento foi descrito pela primeira vez em 1890 e representa um dos mecanismos ativadores e amplificadores da imunidade humoral e inata, promovendo proteção contra invasão de micro-organismos através de mecanismos dependentes e independentes de anticorpos. Consiste em um complexo formado por, aproximadamente, 35 proteínas séricas e de superfície celular, que interagem entre si e com outras moléculas do sistema imune constituindo uma das principais vias efetoras da resposta imunológica e inflamatória (Fujita, 2002).

As proteínas que compõem o complemento são ativadas em forma de cascata por meio de clivagens proteolíticas sequenciais e formação de

complexos de proteínas. Ainda, desempenham importante papel na manutenção da homeostase do hospedeiro, uma vez que combatem micro-organismos e removem complexos imunes circulantes bem como células apoptóticas (Tulamo *et al.*, 2010).

A cascata do sistema complemento é ativada por três diferentes vias; a primeira descrita como via clássica, que em condições fisiológicas, é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo. A outra via de ativação é a via alternativa, que foi descoberta depois, porém, é filogeneticamente mais antiga e não requer a presença de anticorpo para a sua ativação, sendo iniciada pela ligação covalente de uma pequena quantidade do terceiro componente do Complemento (C3) aos grupos hidroxila ou amina presentes da mesma forma na superfície de micro-organismos, o que não implica neste caso no reconhecimento específico de moléculas (Fujita, 2002).

A terceira forma de ativação foi descrita posteriormente recentemente sendo denominada via das lectinas ou via da MBL (Gulla *et al.*, 2009). Esta via envolve o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície dos patógenos através de receptores de reconhecimento padrão como os existentes na MBL, e a subsequente ativação de enzimas associadas, conhecidas como serino-proteases associadas à MBL (MASPs) (Fujita, 2002).

A MBL parece ser um dos componentes mais versáteis do sistema imune inato, sendo funcionalmente análoga à IgM pois liga-se a vários substratos através de múltiplos receptores. Esta ligação é fraca, entretanto, a interação de vários desses receptores resulta em maior avidéz (Turner, 1996). Para Degan *et al.*, (2007) também pode ser comparada à IgG e a IgA, por atuar diretamente como opsonina, interagindo com um ou mais receptores de colectina e assemelhando-se a C1q pois interage com outras serinoproteases (MASP1 e MASP2) para que ocorra ativação do sistema complemento.

A opsonização é a principal função biológica desta lectina, pois sua estrutura permite a ligação com receptores presentes nos fagócitos. A MBL, uma vez ligada, é capaz de iniciar uma variedade de atividades antimicrobianas, como lise da célula patogênica através da formação do complexo de ataque à membrana (Garcia-Laorden *et al.*, 2008; Silva e Chies, 2010).

A estrutura protéica da MBL tem sido estudada extensivamente e consiste em múltiplos de cadeias polipeptídicas idênticas de 32 kDa, possuindo cada cadeia quatro regiões distintas codificadas por éxons diferentes do gene *MBL2* (Dommett *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2009). Cada cadeia apresenta uma região C-terminal com um domínio de reconhecimento de carboidratos cálcio-dependente (DCR), através do qual a MBL se liga aos diferentes patógenos; uma curta região hidrofóbica  $\alpha$  – helicoidal chamada de pescoço; uma região colagenosa contendo 19 trincas Gly-Xaa-Xaa e uma região N-terminal rica em cisteína (Carvalho, 2006; Dommett *et al.*, 2006).

Três cadeias polipeptídicas formam uma tripla hélice, interagindo através das regiões colagenosas. A região hidrofóbica de cada cadeia apresenta forma espiralada e os domínios de reconhecimento de carboidratos apresentam características de proteínas globulares (Carvalho, 2006; Dommett *et al.*, 2006). O trímero é estabilizado por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre regiões N-terminais, ricas em cisteína, de cada cadeia. Esta forma trimérica é a subunidade estrutural básica de todas as formas circulante de MBL (Ip *et al.*, 2009).

A MBL sérica consiste de oligômeros, variando de dímeros a hexâmeros, que formam uma estrutura quaternária que, por meio de cristalografia de raio-x/eletromicrografia, se assemelham a um “buquê de tulipas”, devido a uma interrupção na região de colágeno, dando origem a uma torção/dobradiça na estrutura da tripla-hélice (Carvalho, 2006; Dommett *et al.*, 2006). Ainda liga-se a açúcares como D-manose, L-fucose e N-acetil-D-Glucosamina expressos na superfície de vírus, bactérias e fungos, levando a ativação do sistema complemento. Destes açúcares, muitos não estão normalmente expostos, em grandes quantidades, nas superfícies celulares de mamíferos, o que dificulta o reconhecimento de estruturas próprias pela MBL e favorece a interação mais apropriada com superfícies celulares microbianas (Casanova *et al.*, 2004; Carvalho, 2006). Além das estruturas de açúcares, tem sido demonstrado que a MBL também pode se ligar a fosfolípidios (Kilpatrick, 1998), ácidos nucleicos (Palaniyar *et al.*, 2004) e proteínas não-glicosiladas (Ip *et al.*, 2009).

A MBL como todas as proteínas pertencentes à família das colectinas, mostra-se seletiva e dependente de cálcio ao realizar ligação com os açúcares

D- manose, L-fucose e N-acetil-D-glucosamina, os quais possuem grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel hexose em uma orientação equatorial, porém não apresenta seletividade para D-galactose e ácido siálico. Essa seletividade baseia-se na presença de resíduos de aminoácidos conservados dentro de seus DCRs (Holmskov *et al.*, 2003; Ip *et al.*, 2009).

O DCR contém uma região formada por três aminoácidos (Glu-Pro-Asn) que proporciona preferência por açúcares com grupos hidroxilas equatoriais 3-OH e 4-OH encontrados na superfície de vários patógenos. A presença desse trímero de aminoácidos é essencial para a capacidade de distinção entre açúcares próprios e não-próprios, uma vez que a maioria das estruturas de carboidratos animais é encerrada por ácido siálico e galactose não reconhecidos pela MBL (Jack *et al.*, 2001; Ip *et al.*, 2009).

O domínio  $\alpha$ -helicoidal da região do pescoço fornece flexibilidade para a orientação do DCR que reconhece a orientação específica dos grupos hidroxilas presentes em determinados açúcares, como D-manose e L-fucose. No entanto, a afinidade de um único DCR a um polissacarídeo é fraca, e portanto, uma forte interação requer ligações simultâneas de múltiplos DCRs (Ip *et al.*, 2009).

Estudos estruturais têm demonstrado que os três sítios de ligação de uma subunidade da proteína MBL (ou seja, a tripla hélice) são separados por uma distância constante de 45 Å (Ip *et al.*, 2009). Devido a essa distância, a ligação a uma molécula simples de manose se torna inviável, favorecendo tal interação com padrões repetitivos de açúcares. Embora a afinidade de cada interação lectina-açúcar seja apenas  $10^{-3}$  M, a oligomerização da MBL permite uma ávida ligação aos carboidratos, dada pela presença de múltiplos sítios que se ligam simultaneamente (Carvalho, 2006). Segundo Garred *et al* (1992), formas com menor grau de polimerização ligam-se menos avidamente aos açúcares, além de apresentarem falhas na ativação do sistema complemento.

Estudos têm sugerido que a MBL atua em processos inflamatórios, através do estímulo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6. Entre outras funções, a proteína ainda reconhece estruturas próprias alteradas e depura células apoptóticas (Carvalho, 2006; Dommett *et al.*, 2006).

Para que a MBL exerça sua atividade funcional completa, é necessário que esteja no mínimo na forma de tetrâmero (Carvalho, 2006; Dommett *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2009). E uma vez que ocorra a ativação do sistema complemento pela via das lectinas, é necessário que a proteína MBL forme um complexo, por meio de sua região colagenosa, com diferentes zimogênios denominados MASP-1, MASP-2, MASP-3 e a uma pequena proteína não enzimática a MAp 19 ou sMAp (Carvalho, 2006).

Estudos sugerem que a ligação da MBL à superfície celular do patógeno inicia uma auto-ativação da MASP-2, ocorrendo clivagem do C4 e C2 para a formação da C3 convertase (C4bC2a); enquanto que a MASP-1 cliva apenas o C2 (Matsushita *et al.*, 2000; Wallis, 2003). Esta ativação resulta na formação do complexo de ataque a membrana (MAC), que permite a penetração de líquidos e íons causando lise dos micro-organismos (Neth *et al.*, 2000; Neth *et al.*, 2002) além da formação de peptídeos que regulam as respostas inflamatórias e imunes (Dinasarapu *et al.*, 2013).

### **2.2.1 Polimorfismo no gene *MBL2* e a deficiência de MBL**

No genoma humano, existem dois genes para a MBL, mas apenas o *MBL2* codifica uma proteína funcional, visto que o *MBL1* trata-se de um pseudogene. Os níveis séricos de MBL são determinados geneticamente e polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) evidenciados na região promotora e no éxon 1 influenciam na concentração e na estabilidade da proteína, respectivamente (Garred *et al.*, 2006).

O gene codificador da MBL é formado por quatro éxons e três íntrons e encontra-se no cromossomo 10 (10q11.2-q21) (Sastry *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989). O primeiro éxon codifica o peptídeo sinalizador, a região rica em cisteína e parte da região de colágeno. A outra porção do domínio de colágeno é codificada pelo éxon 2. Os éxons 3 e 4 codificam a região  $\alpha$ -hélice e o DCR, respectivamente (Chagas *et al.*, 2005; Monticielo, 2008).

Três SNPs foram encontrados na região estrutural da molécula nos códon 52, 54 e 57 do éxon 1 resultando em três variantes alélicas chamadas de alelos D, B e C respectivamente, sendo a presença de qualquer um desses

polimorfismos denominados alelo 'O'. Por convenção o tipo selvagem do gene é chamado de alelo 'A', estando associado a níveis normais de MBL (Worthley *et al.*, 2005; Bouwman *et al.*, 2006).

As mutações no éxon 1 do *MBL2* comprometem a capacidade de oligomerização da proteína final, em virtude da troca de aminoácidos que tais mutações acarretam, apresentando os monômeros variantes e, conseqüentemente, baixa capacidade de fixação de complemento (Eisen: Minchinton, 2003; Bouwman *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2009). No caso das variantes B e C, a substituição de glicinas axiais da tripla hélice de colágeno por ácidos decarboxílicos, resulta na distorção da hélice e desestabilização do polipeptídeo. Enquanto que na variante D, o efeito da mutação implica na substituição de um resíduo de arginina por um de cisteína (Madsen *et al.*, 1994). A presença de resíduos extras de cisteína provoca formação de pontes de dissulfeto adicionais, reduzindo dramaticamente a formação de oligômeros mais complexos (Dommett *et al.*, 2006).

O alelo B tem sido identificado em várias populações eurasiáticas, contudo o alelo C é característico de populações africanas do sub-Saara, sugerindo que estas mutações aconteceram após migrações na África ocorridas entre 100 mil e 150.000 mil anos atrás (Turner, 1996; Turner, 1998; Turner *et al.*, 2000). Indivíduos homozigotos para códon variantes da MBL representam cerca de 5% dos europeus da região norte e americanos do norte (Roy *et al.*, 2002).

A frequência do alelo B, em certos grupos de índios da América do Sul, é de 80%. O alelo C está presente em 32% dos indivíduos do oeste da África. Em contrapartida, nenhum alelo variante foi encontrado nos aborígenes australianos. Os alelos C ou D estão ausentes em esquimós e em certas populações da América do Sul. A alta frequência de alelos variantes *MBL2*, em diferentes grupos étnicos e diferentes áreas demográficas, sugere que a desvantagem imunológica de se ter baixos níveis de MBL no soro, de alguma maneira tem benefícios (Bouwman *et al.*, 2006).

Estudo do polimorfismo do éxon 1 do gene MBL através da técnica de PCR em tempo real e curva de "melting" tem sido utilizado (Hladnik *et al.*, 2002). Segundo Segat *et al* (2007) a frequência dos genótipos AA, AO e OO,

em indivíduos do estado de Pernambuco foi de 67%, 27% e 6%, respectivamente, e, dos alelos A e O foi de 80% e 20%, respectivamente.

Estudos sugerem que todas as três variantes impedem a MBL de exercer efetivamente o seu papel nas formas homo ou heterozigotas, ou ainda tornam as subunidades mais vulneráveis à degradação. Consequentemente, os alelos D, B e C resultam em deficiência completa ou em níveis séricos baixos da proteína (Garred *et al.*, 2006; Garcia-Laorden *et al.*, 2008). Ao contrário de algumas proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa, cujos níveis podem aumentar até 1000 vezes durante a inflamação; os níveis de MBL são relativamente constantes com aumento de duas a três vezes durante processos inflamatórios (Thiel *et al.*, 1992).

### **2.2.2 Lectina Ligadora de Manose e a associação com doenças**

A MBL possui papel controverso na imunidade inata, devido ao seu caráter duplo, sendo relatada por alguns autores como “Jekyll - and - Hyde” (faca de dois gumes) (Silva: Chris, 2010). As implicações relacionadas aos baixos níveis de MBL têm sido alvo de um grande número de pesquisas. Estudos mostram que a deficiência de MBL está associada à maior susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes, podendo influenciar na gravidade e curso clínico (Jack *et al.*, 2001; Ogden *et al.*, 2001; Eisen *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006).

O primeiro caso associando doença com deficiência de MBL foi relatado em 1968 em uma criança que sofria de dermatite grave, diarreia e infecções bacterianas recorrentes, indiferente ao uso de antibióticos e terapia com esteróides. Entretanto, com infusão de plasma fresco o defeito na fagocitose era corrigido. Este defeito também foi observado em familiares e concluído que se tratava de uma condição genética. Mais tarde, o defeito identificado na fagocitose foi atribuído ao polimorfismo do gene MBL2 (Worthley *et al.*, 2005; Bouwman *et al.*, 2006).

Atualmente uma grande variedade de patologias tem sido associada à deficiência de MBL, tais como susceptibilidade aumentada a infecções virais e bacterianas, a arteriosclerose, leucemias e abortos espontâneos além de

aumento de crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme (Christiansen *et al.*, 1999; Rugonfalvi-kiss *et al.*, 2002; Schmiegelow *et al.*, 2002; Eisen *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 2010).

Os níveis plasmáticos de MBL diminuídos podem estar associados a defeitos de opsonização e fagocitose, resultando dentre outras consequências na ocorrência de uma variedade de doenças infecciosas. Acredita-se que este defeito seja freqüente na população geral (5 a 7%) sugerindo tratar da imunodeficiência primária mais comum (Steffensen *et al.*, 2000; Jack *et al.*, 2001; Guardia e Lozano, 2003).

Devido à alta freqüência de alelos variantes de MBL em diferentes populações, foi levantada a hipótese de que a deficiência desta proteína poderia conferir algum grau de proteção contra certas doenças infecciosas. Quando Garred *et al.* (1992a) analisaram o nível de MBL em 56 africanos do Quênia, descobriram que dez indivíduos tinham níveis abaixo do limite de detecção do teste. Baseado nesta elevada freqüência de deficiência, os autores sugeriram que os baixos níveis circulantes poderiam proteger contra infecções por micro-organismos intracelulares que exibem ligantes para MBL em sua superfície.

Em apoio ao efeito protetor de deficiência de MBL, foi observado que etíopes infectados com o *Mycobacterium leprae* tinham um nível significativamente mais elevado de MBL do que os controles não infectados (Garred *et al.*, 1994). Subsequentemente, foi demonstrado que indivíduos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* apresentavam nível de MBL mais elevado do que os controles sadios (Garred *et al.*, 1997b).

Ambrosio (2005) demonstrou que a ligação da MBL a *Leishmania brasiliensis* não induz ou altera a lise mediada pelo complemento. É provável que a deposição de MBL nas superfícies das promastigotas e amastigotas favoreçam o seu escape da lise pelo complemento. Outros estudos têm apoiado a hipótese de um possível papel protetor de alguns alelos do gene *MBL2* na infecção por micro-organismos intracelulares que utilizam a opsonização por C3b e seu receptor para entrar na célula do hospedeiro. Assim, mecanismos que diminuem a ativação do complemento podem dificultar a entrada e a conseqüente disseminação desses patógenos (Bellamy *et al.*,

1998; Hoal-Van Helden *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001; Bonar: Chmiela: Rozalska, 2004; Cruz *et al.*, 2013). Entretanto, é importante observar que a diminuição nos níveis de MBL pode aumentar a vulnerabilidade do indivíduo a otite média, diarreia crônica e meningite, já tendo sido isolados patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, espécies de *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* (Summerfield *et al.*, 1995; Aittoniemi *et al.*, 1997).

Além da superfície de bactérias, estudos mostram que a MBL se liga também a parasitas, como *Trypanosoma cruzi* (Kahn *et al.*, 1996), *Schistosoma mansoni* (Klabunde *et al.*, 2000). A presença desta proteína na superfície de um parasita pode permitir a captação celular tanto pela via direta do receptor MBL, quanto por receptores para fragmentos do complemento depositados no parasita como resultado da ativação do complemento pela via das lectinas (Garred *et al.*, 1994).

Kelly *et al.* (2000) evidenciaram que indivíduos homocigotos para mutações estruturais no códon 54 do éxon 1 do gene *MBL2* apresentavam um risco aumentado para criptosporidiose, tendo sido encontrada uma associação dependente da concentração da MBL com a presença de esporozoítas. O risco aumentado de criptosporidiose, na deficiência da MBL, parece incluir os pacientes com AIDS. O funcionamento supostamente ocorre por ativação do complemento em esporozoítas, mediada por MBL.

Os protozários também estão incluídos na ampla diversidade de microrganismos que se ligam a MBL, dentre os muitos, estão a *Leishmania major*, *L. mexicana* e *Plasmodium falciparum* (Garred *et al.*, 1994; Klabunde *et al.*, 2002). Em um estudo feito por Klabunde *et al.*, 2002, investigou-se que a interação entre a MBL e as proteínas de eritrócitos infectados com o *P. falciparum*, mostrou que apesar da MBL se ligar a estas proteínas, não foi possível inibir o seu crescimento.

Em relação às infecções virais, Tan *et al.* (2009) observaram em estudos realizados na China, que a frequência de genótipos mutantes foi significativamente maior em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) quando comparados aos controles, e apresentava-se associada a progressão da doença. Da mesma forma, estudo realizado por Silva e Chies (2010), os polimorfismos do gene *MBL2*, com

conseqüente diminuição dos níveis séricos da proteína, foram encontrados em maior frequência em pacientes HIV positivos, de Porto Alegre, Brasil, quando comparados ao grupo controle, indicando que esses pacientes podem apresentar uma maior dificuldade na eliminação do patógeno, aumentando assim a susceptibilidade à infecção pelo HIV.

Correlacionando o polimorfismo do gene *MBL2* a infecções virais, Pedrosa *et al.* (2008) em estudo realizado em Curitiba, Brasil, observaram que polimorfismos nesse gene estavam relacionados ao desenvolvimento de hepatite C crônica. Estudos foram também realizados constatando-se associação entre o polimorfismo do gene à progressão da infecção pelo vírus da hepatite B à cirrose e ao carcinoma hepatocelular (Chong *et al.*, 2005).

Além dos estudos realizados buscando associar deficiência de MBL a infecções bacterianas e virais, há pesquisas que buscam correlacionar essa mesma deficiência a infecções fúngicas. Segundo Crosdale *et al.* (2001), a deficiência de MBL é um fator genético que predispõe o indivíduo a desenvolver aspergilose pulmonar, sendo o polimorfismo no códon 52, particularmente mais comum nos pacientes que desenvolvem esta micose, sugerindo o envolvimento desta mutação na susceptibilidade a aspergilose.

Milanese *et al.* (2008) observaram falta de associação no polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* a deficiência de MBL e candidíase vulvovaginal recorrente. Da mesma forma, Eisen *et al.* (2008) não encontraram associação entre baixos níveis séricos de MBL e sua capacidade funcional alterada ou mesmo polimorfismo no gene dessa proteína e criptococose em pacientes imunocompetentes. Apesar destes trabalhos não evidenciarem associação entre micoses e polimorfismos no gene *MBL2*, a literatura majoritária aponta em sentido contrário (Babula *et al.* 2005; Giraldo *et al.* 2007).

Babula *et al.* (2005) conduziram um estudo em mulheres com história de candidíase vulvovaginal recorrente e verificaram que estas pacientes apresentaram níveis de MBL significativamente baixos e um aumento na ocorrência de alelos variantes. De maneira semelhante Giraldo *et al.* (2007) desenvolveram um estudo no Rio Grande do Norte, Brasil, buscando associar polimorfismo no gene *MBL2* e diagnóstico de candidíase vulvovaginal recorrente e observaram que mulheres com esta infecção apresentavam

frequência do alelo mutante duas vezes e meia maior quando comparadas ao grupo controle.

Os relatos também mostram que a predisposição das mulheres brasileiras a candidíase vulvovaginal está significativamente associada com polimorfismo no códon 54 do éxon 1 do gene *MBL2*, estando esta mutação correlacionada com níveis baixos dessa proteína e que polimorfismo neste mesmo códon predispõe as mulheres brasileiras a candidíase vulvovaginal recorrente (Henic *et al.*, 2010; Wojitani *et al.* 2012).

No entanto, trabalho realizado com camundongos deficientes em MBL demonstrou que a ausência dessa proteína não altera a resistência a disseminação de candidíase (Lee *et al.*, 2002). Da mesma maneira, Choi *et al.* (2005) afirmaram que não há associação significativa entre susceptibilidade a candidíase disseminada crônica em pacientes que sofrem de leucemia e o polimorfismo em genes envolvidos na imunidade inata. Os autores não consideram a presença de alelos mutantes do gene *MBL2* como fator de risco para a disseminação.

Kaur *et al.* (2007) evidenciaram que o tratamento com MBL humana recombinante em modelo murino de aspergilose pulmonar invasiva resultou em melhora da sobrevivência dos animais.

Asbeck *et al.* (2008) observaram que o soro de pacientes com deficiência de MBL diminuiu a capacidade de opsonização ao testarem amostras de *Candida parapsilosis*, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* não encapsulado. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foram testados e a MBL desempenhou menor papel no processo de opsonização destes micro-organismos quando comparadas as leveduras. O trabalho de Brouwer *et al.* (2008) demonstrou os mesmos resultados ao testarem amostras apenas de *C. albicans* e *Streptococcus pneumoniae*.

Helda *et al.* (2008), ainda, induzindo infecção sistêmica por *Candida albicans* em camundongos deficientes de MBL, observaram que os animais foram mais susceptíveis ao desenvolvimento da micose, tornando difícil o seu controle devido a falta de opsonofagocitose.

Van Till *et al.* (2008) descreveram que pacientes com peritonite de etiologia fúngica, comumente atribuída a *C. albicans* e *C. parapsilosis* tiveram

níveis plasmáticos mais baixos de MBL do que pacientes sem esse tipo de infecção. A incidência de infecções fúngicas abdominais em pacientes com genótipo variante foi significativamente maior que naqueles que não têm essa mutação.

Em 2009, Ampel e colaboradores realizaram estudo avaliando os níveis de MBL em pacientes com coccidioidomicose ativa e concluíram que os pacientes, com qualquer forma sintomática da doença, apresentavam baixos níveis da proteína, sugerindo uma associação entre níveis deficientes da MBL e a coccidioidomicose sintomática.

Demiens *et al.* (2012) estudaram as variações nos níveis de MBL durante o curso de candidíase invasiva e observaram considerável redução na concentração sérica desta proteína, sugerindo um papel importante da MBL nas etapas iniciais da patologia observada.

Ainda, Nedovic *et al.* (2014) em trabalho de revisão sistemática, afirmam que polimorfismos no gene *MBL2*, particularmente no códon 54, impactam sobre a susceptibilidade do hospedeiro a infecções por *Candida* sp. Os autores comentam que a MBL pode influenciar a resposta imune inata de mulheres a *Candida*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a relação entre a fisiopatologia das úlceras de membros inferiores e infecções microbiológicas em portadores de anemia falciforme, correlacionando com possível polimorfismo do gene *MBL2* e caracterizar os agentes fúngicos quanto à formação de biofilme e sensibilidade antifúngica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diagnosticar infecções microbianas secundárias às úlceras de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme;
2. Analisar a similaridade genética entre isolados fungicos provenientes de UMIs;

3. Detectar a capacidade de formação de biofilme das culturas de fungos isolados das amostras de úlceras de membros inferiores;
4. Avaliar atividade antifúngica *in vitro* e correlacionar a concentração inibitória e fungicida das drogas;
5. Verificar o grau de hemólise e os níveis de hemoglobina total, HbS e Hb Fetal dos pacientes com anemia falciforme portadores de úlcera de membro inferior;
6. Determinar os haplótipos  $\beta^S$  dos pacientes com anemia falciforme e sua relação com o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores;
7. Correlacionar o polimorfismo na região promotora e no exon 1 do gene *MBL2* com as úlceras de membros inferiores associadas à anemia falciforme e a susceptibilidade a infecções microbianas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Antecedendo às etapas de coleta, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE/PE sob o registro 029/2011, de acordo com o previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

### 4.2 PACIENTES

Os critérios considerados para a inclusão na pesquisa foram: pacientes portadores de doença falciforme acima de 18 anos de idade acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação Hemope (HEMOPE), Recife – PE, com desenvolvimento de úlceras de membros inferiores, com prontuários ativos e atualizados. Os critérios de exclusão incluíram: uso de antibióticos antecedendo até 10 dias da coleta e uso de hidroxiuréia.

Dos pacientes foram analisados os perfis clínicos, laboratoriais e moleculares.

### 4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

Os procedimentos para obtenção das amostras clínicas constaram de limpeza do local da lesão com solução salina estéril, para a remoção dos tecidos desvitalizados e sujidades. Em seguida, debridamento do material descamativo necrótico e frouxo da superfície da ferida. Posteriormente foi aplicada gaze estéril para absorver o excesso de salina e então realizada rolagem do *swab* em áreas vascularizadas de tecido de granulação (leito da úlcera), com pressão suficiente para obter fluido da ferida.

O material biológico coletado do leito da úlcera foi armazenado e transportado em duas condições distintas: 1. Material coletado com auxílio de dois *swabs*, imediatamente acondicionados em meio de transporte Stuart para realização do diagnóstico bacteriológico conduzidos ao Laboratório Central do Estado de Pernambuco – LACEN. 2. Material coletado por meio de um *swab*, armazenado em recipiente contendo água destilada com antibiótico

(cloranfenicol 50mg/L) para diagnóstico micológico no Laboratório de Micologia Médica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram coletadas ainda, 5mL de sangue por punção venosa em tubos contendo EDTA para as análises hematológicas e moleculares e em tubos isentos de anticoagulantes para os ensaios bioquímicos a serem realizados no laboratório de Hemoglobinopatias no Setor de Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) e Setor de Hematologia do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

#### 4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

##### 4.4.1 Exame bacteriológico

O exame direto da secreção obtido da úlcera foi realizado através do rolamento do *swab* contendo a amostra clínica em lâmina para posterior coloração utilizando a técnica de Gram. A amostra clínica contida no outro *swab* foi inoculada em tubos contendo Caldo Tioglicolato, sendo incubados em estufa bacteriológica a  $35^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após 24 horas as amostras acondicionadas em Caldo Tioglicolato foram semeadas nos meios ágar sangue, ágar chocolate e ágar MacConkey para análise do crescimento bacteriano após enriquecimento.

##### a) Identificação das culturas bacterianas

A identificação das espécies bacterianas foi realizada no equipamento VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc.).

##### 4.4.2 Exame micológico

O processamento das amostras clínicas para exame direto ocorreu sem adição de corante ou clarificante. Concomitantemente, o material biológico foi semeado em quadriplicata na superfície dos meios Sabouraud Dextrose Agar e ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) adicionados de 50mg/L de cloranfenicol contidos na superfície de placas de Petri, mantidas duas a  $30^{\circ}\text{C}$  e duas a  $37^{\circ}\text{C}$

durante 15 dias (LACAZ *et al.*, 2002). Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e, posteriormente, identificadas.

#### a) Purificação das culturas de leveduras

As leveduras foram purificadas a partir de fragmentos da colônia suspensos em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão 0,2mL foram semeados por esgotamento em estrias na superfície do meio SDA com antibiótico contido em placas de Petri. As colônias que surgiram foram avaliadas, então selecionadas e semeadas em tubos de ensaio contendo meio SDA com extrato de levedura para posterior identificação (Barnnet *et al.*, 2000; De Hoog *et al.*, 2000).

#### b) Identificação das leveduras

A identificação foi realizada com base na taxonomia clássica através da análise das características macroscópicas (bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento), microscópicas (estruturas somáticas e reprodutivas) e fisiológicas/bioquímicas (assimilação de compostos de carbono e nitrogênio, fermentação de fontes de carbono) (Barnett *et al.*, 2000; Hoog *et al.*, 2000) e produção de urease (Lacaz *et al.*, 2002). A identificação foi procedida ainda, pelo sistema automatizado VITEK® 2 e quando necessário, foi realizado sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 do DNAr (White *et al.*, 1990).

##### a. Identificação morfofisiológica das leveduras

###### aa. Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (Auxonograma)

Os testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foram realizados com suspensões em água suplementada com extrato de levedura de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, 2mL foram semeadas *pour plate* no meio C (isento de carboidratos) para assimilação de fontes de carbono e meio N (isento de fontes de nitrogênio) para assimilação de fontes

de nitrogênio respectivamente. Após solidificação, foram adicionadas as fontes a serem testadas de carbono e nitrogênio respectivamente, sendo as placas mantidas a 30°C e a leitura realizada a cada 24 horas por até 72 horas. A interpretação do teste foi realizada por meio da observação da formação do halo ao redor da fonte assimilada, ou seja, utilização da fonte para crescimento (capacidade assimilativa) (Barnett, Paine e Yarrow, 2000).

ab. Fermentação de fontes de carbono (Zimograma)

O teste foi realizado em tubos de ensaio (150 por 12mm), contendo no interior pequenos tubos invertidos de Durham (50mm x 6mm). Estes foram preenchidos com água peptonada acrescida das diferentes fontes de carbono na concentração de 4%. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 100µL da suspensão da amostra previamente ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland. Os tubos foram então incubados a 28°C por 10 dias e observados diariamente para verificação da capacidade de fermentação do isolado. Desta forma, o tubo de Durham completamente vazio, foi considerado como a fonte fermentada (Barnett; Paine; Yarrow, 2000).

ac. Hidrólise da Ureia

As amostras de fungos com até 48h de crescimento foram semeadas em meio ágar Christensen's contidos em tubos, os quais foram incubados a 37°C por até cinco dias. Os tubos foram examinados após esse período a fim de verificar a mudança de cor do meio de amarelo para rosa, indicando a produção de urease pelo isolado (Barnett; Paine; Yarrow, 2000).

b. Identificação automatizada das leveduras

A identificação por meio do sistema automatizado VITEK<sup>®</sup> 2 (BioMérieux, França) foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. A técnica emprega cartões para a identificação de leveduras com poços contendo carboidratos desidratados de galactose, lactose, sacarose, maltose, celobiose,

metil-D-glicosídeo, xilose, arabinose, trealose, melezitose, rafinose, xilitol, dulcitol, adonitol, palatinose, glicerol, sorbitol, eritritol, melibiose, glicose, inositol, 2-ceto-D-gluconato e N-acetil-Dglicosamina. Além destes, há poços contendo outros substratos bioquímicos como cicloheximida, nitrato e ureia e áreas reservadas para controle negativo.

A metodologia de identificação baseia-se nos métodos bioquímicos estabelecidos por Wickerham (1975) e Wickerham & Burton (1948). O inóculo, incubação e leitura dos cartões foram procedidos de acordo com as especificações do fabricante. Culturas puras semeadas por esgotamento em placas de Petri contendo SDS acrescido de extrato de levedura 1% e incubadas à 37° C por 24 horas foram utilizadas. Subsequentemente, colônias isoladas foram suspensas em tubos de ensaio (12x75mm) contendo 1,8mL de água estéril a 0,5% (pH 7,0) para produzir um inóculo visualmente equivalente ao padrão 2 da Escala de McFarland. Os cartões de identificação foram preenchidos com este inóculo, selados e incubados à 30° C por 24 horas. Após o período de incubação, foi feita a leitura dos resultados por automação em leitora/incubadora, empregando o *software* VITEK, (BioMerieux, França). O *software* determina o poço que é positivo com base na diferença de quantidade de luz transmitida através do poço-controle negativo.

A diferença na transmissão de luz indica o crescimento. Ao término da análise dos perfis bioquímicos, o equipamento imprimiu um relatório de identificação para cada cartão. O grau de certeza de identificação foi dado por percentuais de probabilidade. A identificação foi considerada correta e completa quando os percentuais de probabilidade foram  $\geq 85\%$  e não havia a solicitação de testes suplementares. De outro modo, a identificação foi considerada incompleta. Esta foi também considerada incompleta, se testes suplementares foram solicitados, mesmo com percentuais de probabilidade  $\geq 85\%$ .

### c. Identificação molecular das leveduras

#### ca. Obtenção de biomassa e extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada segundo a técnica descrita por Goes Neto *et al.*, (2005). De uma cultura de 48 horas de crescimento a 37°C em placas de Petri contendo meio SDA (Difco) suplementado com extrato de levedura, a massa de células foi então transferida para um tubo de microcentrifuga contendo 400 µL pérolas de vidro de 212-300 µM de diâmetro (SIGMA) onde 600 µL de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) aquecido a 65 °C foram adicionados. Os tubos foram, em seguida, agitados em FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, Nova Iorque, EUA) durante 1 min a uma velocidade de 5,5 m / s (metros por segundo) e incubação a 65° C durante 1 h. Após centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 2,0 mL e, então, foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24: 1) para desproteínizar o extrato de levedura por 10 minutos, após mais uma etapa de centrifugação (13.000 rpm/10 minutos). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, então, foi adicionado isopropanol, no mesmo volume da fase recuperada, para precipitação do DNA à temperatura -20°C “over night”.

As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 1mL de etanol 70%. Após nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o sedimento foi seco em estufa a 37°C por 15 minutos e ressuspenso em 55 µL de TE [EDTA 1 mM; Tris-HCl 1 mM; pH 8,0]. As soluções de DNA genômico foram conservadas a -20°C até o momento do uso.

#### cb. Reação de PCR

As amostras de DNA genômico foram submetidas a PCR para a amplificação do DNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para estudo da região do ITS (White *et al.*, 1990). A reação de PCR utilizada foi a seguinte: 1,0 µL de DNA; 2,5 µL de tampão 10X; 3,0 µL de DNTP (estoque com 1,5 m mol L<sup>-1</sup>); 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (20 m mol L<sup>-1</sup>); 3,0 µL do oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (25 n̄mol); 3,0 µL do oligonucleotídeos iniciadores ITS4 (25

nmol); 0,5 unidades da enzima Taq polimerase (5 unidades/ $\mu\text{L}$ ); 10,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura para completar o volume da reação para 25 $\mu\text{L}$ . A reação de PCR foi obtida nas seguintes condições: 94 °C por 2 min, seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 35 s, e com uma extensão final de 72 °C por 10 min e mantidas em 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído. A reação de PCR foi realizada em termociclador Flexigene Thermocycler (Techne, Cambridge, United Kingdom). Os fragmentos de DNA gerados pela PCR foram separados por eletroforese (1,5 % gel de agarose) por 2 h, a 60 mV em TBE 1X. Posteriormente, foi feita a visualização do gel com brometo de etídio para observação do produto amplificado.

#### cc. Sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos purificados após amplificação foram sequenciados bidirecionalmente utilizando-se o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados na amplificação (ITS1 e ITS4). A reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 poços, contendo cada um o produto de PCR, o *mix* e o iniciador específico. O volume final em cada poço da placa foi de 10  $\mu\text{L}$  no qual continha 20–40 ng de DNA (2  $\mu\text{L}$  de DNA), 0.5  $\mu\text{L}$  de pré-mix *BigDye*, 1,75  $\mu\text{L}$  de tampão de sequenciamento, 4,75  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 1  $\mu\text{L}$  de iniciador a 5  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ . Posteriormente, a placa preparada foi ciclada num termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA), em 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Após a ciclagem, os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados a fim de eliminar o excesso de iniciadores, sais, dNTPs e ddNTPs não incorporados.

A cada poço da placa foram adicionados 1,0  $\mu\text{L}$  de EDTA 125 mM e 1,0  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3M. Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento, sendo esta vedada, homogeneizada e incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 40 minutos a 3700 rpm e 20°C. Nesta etapa ocorreu a precipitação das moléculas de DNA. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e os *pellets* lavados com 35  $\mu\text{L}$  de etanol



(5'-AGTCAGCCAAC-3'). A reação de RAPD foi procedida de acordo com o protocolo proposto por Lieckfeldt *et al.* (1993).

Cada reação foi composta por uma mistura contendo 50 ng de DNA genômico; 0,25 mM de dNTP; 0,5µM do primer apropriado; 0,04 U de Taq DNA polimerase no tampão de PCR fornecido pelo fabricante e 2,7µM de MgCl<sub>2</sub>. O volume final da mistura da reação foi de 25µl.

As amostras foram amplificadas em termociclador Flexigene Thermocycler (Techne, Cambridge, United Kingdom) seguindo o protocolo: primeiro ciclo de desnaturação por 5 minutos (min) a 93°C; seguido por 40 ciclos de 20 segundos (seg) a 93°C, 45 seg a 55°C e 90 seg a 72°C cada; a extensão final foi de 6 min a 72°C.

Os produtos resultantes da amplificação do DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,3% contendo brometo de etídio (0.5 mg/ml), sendo utilizado tampão TAE (40 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA) a 100 V por 30 minutos e um marcador de DNA de 100-pb. As bandas de DNA foram visualizadas através de iluminação com ultravioleta.

#### 4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada utilizando o método desenvolvido por MELO *et. al* (2011) e modificado por Ruiz *et. al* (2013). As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud a 35°C durante 24 horas. A partir deste cultivo, uma suspensão padronizada contendo 3 mL de salina foi preparada, sendo a turbidez comparável com a escala 4 de MacFarland. Dessa suspensão, 20 µL foram inoculados em 180 µL de caldo Sabouraud suplementado com glicose 8% contido nos poços de microplacas de poliestireno, mantidas a 35°C por 24 horas.

Em seguida o conteúdo foi aspirado e os poços lavados duas vezes com 200 µL de PBS para remover células fracamente aderidas. As placas foram secas por 20 minutos a 35°C. Depois, 110 µL de cristal violeta 0,4% foi adicionado em cada poço e incubado por 45 minutos. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL de água estéril Milli-Q. O processo de descoloração foi realizado por meio do uso de 200 µL de etanol por 45 minutos. Então, 100 µL

de cada poço foram transferidos para uma nova placa e a produção de biofilme foi mensurada utilizando um espectrofotômetro (LP4000) a 595 nm.

Os valores de absorvância dos controles negativos (poços apenas com as culturas) foram subtraídos dos valores das cepas testadas com o objetivo de minimizar potenciais interferências. Cada isolado foi testado em triplicata e a quantificação da produção de biofilme foi registrada como sendo a média aritmética dos valores de absorvância dos três testes.

#### 4.7 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados segundo o método de microdiluição em caldo, de acordo com a padronização publicada nos documentos M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008), e M27-S4 do CLSI (2012). Dois poços controle, um deles isento de inóculo (controle negativo) e o outro isento de antifúngico (controle positivo), foram incluídos no ensaio.

No ensaio foram incluídas linhagens do *American Type Culture Collection* (ATCC), recomendadas pelo método: *Candida krusei* ATCC6528, *C. parapsilosis* ATCC22019 e *C. tropicalis* ATCC750.

##### 4.7.1 Preparação dos antifúngicos

Soluções estoque de anfotericina B, anidulanfungina, voriconazol, cetoconazol e ciclopiroxolamina foram preparadas utilizando como diluente o dimetilsulfóxido (DMSO) e o fluconazol foi preparado com água deionizada.

##### 4.7.2 Meio de cultivo

O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) com L-glutamina, 2,0g/L de glicose, sem bicarbonato de sódio e tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a concentração final de 0,165 mol/L e pH 7,0.

### 4.7.3 Preparação do inóculo

Das colônias crescidas por um período de 24 horas em meio SDA foram preparadas suspensões em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) cuja concentração final foi de  $10^6$  células/mL.

A suspensão resultante foi agitada em vórtex durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 530 nm, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 para uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão de trabalho foi ajustada a 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio RPMI 1640, resultando em uma concentração de  $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL.

### 4.7.4 Teste de susceptibilidade *in vitro*

Para o teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado 0,1 mL de cada droga nas concentrações: anfotericina B (0,03 a 16  $\mu$ g/mL), anidulafungina (0,01 a 8  $\mu$ g/ml), voriconazol (0,03 a 16  $\mu$ g/ml) , fluconazol (0,125 a 64  $\mu$ g/mL), cetoconazol (0,03 a 16  $\mu$ g/mL) e ciclopiroxolamina (0,06 a 32  $\mu$ g/mL). As placas foram mantidas a 35°C e a determinação da concentração inibitória mínima dos antifúngicos foi realizada por observação visual a cada 24 horas para a anidulafungina e 48 horas no caso da anfotericina B, azólicos e ciclopirox olamina.

A CIM para a anfotericina B foi representada pelo poço onde ocorreu 100% de inibição do crescimento fúngico. Para anidulafungina, voriconazol, fluconazol e cetoconazol pelo poço que correspondeu a inibição de 50% do crescimento. Por fim, para o ciclopirox olamina a CIM foi verificada no poço que apresentou 80% de inibição do crescimento fúngico.

Para interpretação dos resultados obtidos, o fungo foi considerado resistente quando apresentou CIM > 1  $\mu$ g/ml para anfotericina B e ciclopirox olamina. Para a anidulafungina, fluconazol e voriconazol as CIMs passaram a ser espécie-específicas de acordo com documento M27-S4 (CLSI 2012) como

demonstrados nas Tabelas 2 e 3. No entanto a interpretação da sensibilidade ao cetoconazol foi realizada pela análise do documento M27-A3 (CLSI 2008).

**Tabela 2** - Interpretação de testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de isolados de *Candida* frente à anidulafungina segundo CLSI (2012) documento M27-S4.

Agente antifúngico	Espécie	CIM (µg/ml)		
		S	I	R
Anidulafungina	<i>Candida albicans</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. glabrata</i>	≤0,12	0,25	≥0,5
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. krusei</i>	≤0,25	0,5	≥1
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4	≥8
	<i>C. guilliermondii</i>	≤2,0	4	≥8

S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente

**Tabela 3** - Interpretação de testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de isolados de *Candida* frente ao fluconazol e voriconazol CLSI (2012) documento M27-S4.

Agente antifúngico	Espécie	CIM (µg/ml)		
		S	DD	R
Fluconazol	<i>Candida albicans</i>	≤2	4	≥8
	<i>C. glabrata</i>	-	≤32	≥64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-
	<i>C. parapsilosis</i>	≤2,0	4	≥8
	<i>C. tropicalis</i>	≤2,0	4	≥8
	<i>C. albicans</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥8
Voriconazol	<i>C. glabrata</i>	-	-	-
	<i>C. krusei</i>	≤0,5	1	≥2
	<i>C. parapsilosis</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1
	<i>C. tropicalis</i>	≤0,12	0,25-0,5	≥1

S: Sensível; DD: Dose-dependente; R: Resistente

#### 4.8 ANÁLISE HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E CLÍNICA

As análises dos índices hematimétricos foram realizadas utilizando o contador eletrônico de células (Coulter T-890, Coulter Corporation, FL, USA).

A quantificação das hemoglobinas Fetal e S foi feita por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA).

Os ensaios bioquímicos foram realizados por equipamento automatizado (ARCHTECT – ROCHE®) sendo realizadas as seguintes dosagens: bilirrubinas total e indireta, lactado desidrogenase e aspartato aminotransferase.

Os dados clínicos foram obtidos através da análise dos prontuários médicos de cada um dos pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital HEMOPE.

#### 4.9 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DOS PACIENTES

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificada (Davis *et al.*, 1986).

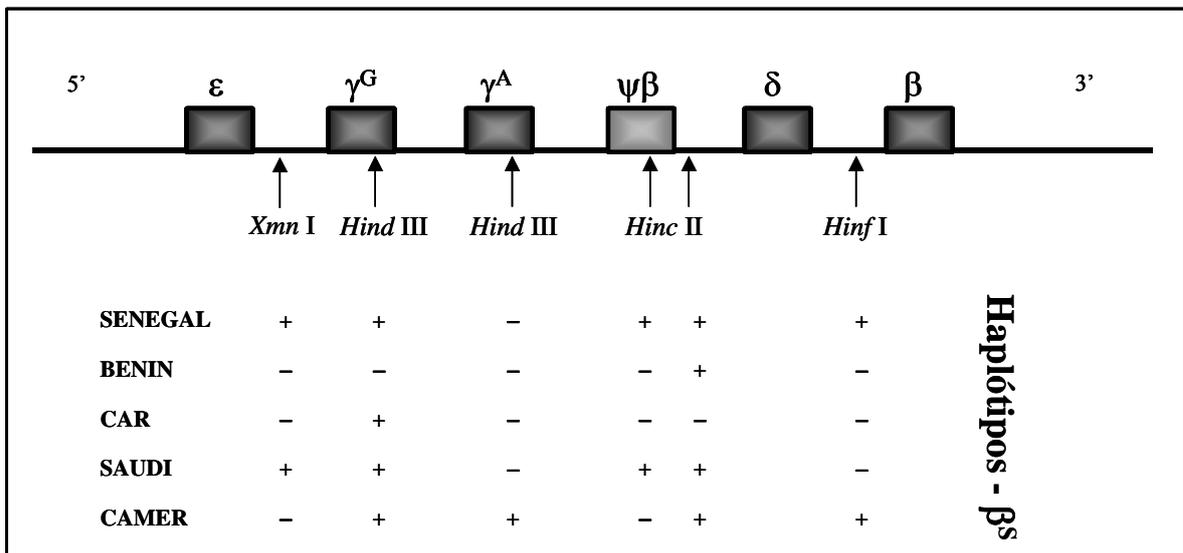
Foi adicionada uma solução contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,144M e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,01M às amostras de sangue periférico para lise dos eritrócitos e após centrifugação o sobrenadante foi desprezado. Ao precipitado foi adicionada a solução TKM1 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 20mM), juntamente com 100 $\mu\text{l}$  de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400 $\mu\text{l}$  da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25  $\mu\text{l}$  de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10%, seguindo incubação à 55°C durante 30 minutos. Após esse período, 180 $\mu\text{l}$  de NaCl 5M foram adicionados à mistura anterior e mantida a 25°C por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado

(*pellet*) lavado com etanol 70% gelado. Ao final, o DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril e armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS $\beta^S$ – PCR E RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

As análises dos polimorfismos de restrição foram realizadas através da amplificação de cada região do DNA que contém os sítios de interesse pelo método da PCR (Tabela 4), seguido de análise de restrição (RFLP). Para os haplótipos  $\beta^S$  foram analisados 6 sítios polimórficos ( $5'\gamma^G$ -*Xmn* I,  $\gamma^G$ -*Hind* III,  $\gamma^A$ -*Hind* III,  $\psi\beta$ -*Hinc* II,  $3'\psi\beta$ -*Hinc* II,  $5'\beta$ -*Hinf* I), segundo Sutton *et al.* (1989) (Figura 1), e assim caracterizados os haplótipos CAR ou BANTO, BENIN, CAMARÃO ou CAMER, SENEGAL, SAUDI ou Árabe - Indiano e, os atípicos, quando não foi possível a caracterização do haplótipo.



**Figura 1** - *Cluster*  $\beta$  mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos  $\beta^S$  segundo Sutton *et al.* (1989).

**Tabela 4** - *Primers* utilizados para amplificação de regiões do *cluster*  $\beta$ : localização referente ao *cluster*  $\beta$  no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>Primer</i>	Direção	Posição	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	5' $\gamma^G$
H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC	←	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	36203	$\gamma^G$
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	$\gamma^A$
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	60906	5' $\beta$
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291	

→: sense; ←: anti-sense.

A composição das reações e condições de amplificação variaram dependendo da região a ser amplificada, e estão representadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

**Tabela 5** - Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ .

Componentes	Volumes ( $\mu$ l)					
	<i>Xmn</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I
	5' $\gamma^G$	$\gamma^G$	$\gamma^G$	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' $\beta$
Tampão (10X)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTP's (10mM)	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Primer 5' (10 $\mu$ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 $\mu$ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA Polimerase (5U/ $\mu$ l)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH <sub>2</sub> O	37,75	38,0	38,0	38,0	38,0	38,25
<b>Volume Final (<math>\mu</math>l)</b>	50	50	50	50	50	50

**Tabela 6** - Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ .

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento 35 ciclos		Extensão		Extensão Final	
	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo
5' $\gamma^G$	94	5'	94	45"	60	45"	72	1'30"	72	7'
$\gamma^G$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
$\gamma^A$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
$\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
5' $\beta$	94	5'	94	45"	57	45"	72	1'30"	72	7'

Para confirmação da amplificação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta, para posterior análise de restrição.

#### 4.11 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO - RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

O produto da PCR foi digerido, a 37°C durante 24 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. A

identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. Como controle foi utilizado amostra de um indivíduo heterozigoto para cada sítio polimórfico. Os tamanhos dos produtos de amplificação após clivagem podem ser observados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

<b>Primers</b>	<b>Enzima</b>	<b>Região</b>	<b>Tamanho Fragmento</b>	<b>Fragmentos Após Clivagem</b>
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5' $\gamma^G$	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	$\gamma^G$	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	$\gamma^A$	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>HinfI</i>	5' $\beta$	380 pb	240 pb + 140 pb

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ , foi possível definir os haplótipos  $\beta^S$  (Figura 1).

#### 4.12 PCR EM TEMPO REAL E A GENOTIPAGEM DO GENE *MBL2*

Foram avaliados dois dos polimorfismos mais importantes na região promotora do gene *MBL2*, as variantes H/L -550 (G/C) e X/Y -221 (G/C). As reações de genotipagem para cada promotor foram realizadas através de uma PCR alelo-específica, utilizando-se dois master mix, um contendo o *primer reverse* selvagem e o outro contendo o *primer reverse* mutante, ambos compartilhando do mesmo *primer forward* (Tabela 7). Ambas as reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 12,5  $\mu$ l, conduzidas com SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems), 0,2  $\mu$ M de cada primer e cerca de 200ng de DNA genômico molde. As condições termais da reação

iniciaram com uma pré-ciclagem de 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos compostos de 30s a 95°C, 30s a 57°C e extensão a 72°C por 30s.

A detecção dos polimorfismos do éxon 1 foi realizada segundo o protocolo descrito por Arraes *et al.* (2006) e baseado na análise da curva de dissociação, utilizando-se o Rotor Gene™ RG 3000 (Uniscience-Cobert Research) como plataforma.

Os SNPs do éxon 1 foram agrupados no alelo “O” quando alguma mutação ocorresse nos códons 52, 54 e 57. No caso do genótipo selvagem, os genótipos foram agrupados no alelo “A”. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25 µl, utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems), 1,25 µM de cada primer (Tabela 8) e cerca de 200ng do DNA genômico. As condições de ciclagem foram as seguintes: desnaturação a 95°C por 2min, seguido por desnaturação a 95°C durante 15s, anelamento e extensão a 60°C por 1min, durante 35 ciclos.

Após amplificação do éxon 1, o produto resultante foi submetido ao protocolo da curva de dissociação o qual iniciou com um lento e progressivo aquecimento de 60°C a 95°C em etapas de 0,2°C com intervalos de 8 segundos entre as etapas. Os cálculos referentes à variação do fluoróforo, resultantes de medidas contínuas de fluorescência (F) em 539nm, foram automaticamente realizados utilizando-se como plataforma o software de dissociação do programa Rotor Gene™ RG 3000 (Uniscience-Cobert Research) versão 6.0.

O pico de dissociação de cada fragmento amplificado foi visualizado por traçado de derivadas negativas de fluorescência com relação à temperatura ( $-dF/dT^{\circ} \times T^{\circ}$ ), gerando curvas que auxiliam a distinguir os perfis de dissociação dos três genótipos do gene *MBL2* (AA, A0 e 00) sendo as temperaturas de dissociação A/A (um pico de  $83.1 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ), A0 (dois picos de  $82.6 \pm 0.3$  e  $80.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) e 00 (um pico de  $81.7 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) (Hladnik *et al.* 2002).

A genotipagem foi realizada sobrepondo a curva de dissociação dos pacientes com a curva de dissociação de três amostras controles, uma selvagem, uma mutante e uma heterozigota. Quando existia uma sobreposição dessas curvas era possível inferir o genótipo em questão. Um controle interno

da reação, livre de DNA, foi incluído para avaliar a qualidade da reação e garantir ausência de contaminação.

Os haplótipos e os genótipos combinados foram computados por meio do programa Arlequin versão 3.01 (disponível em <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>) e identificados por meio de nomenclatura específica. As primeiras duas letras indicando variantes da região promotora (alelos H/L e X/Y) e a terceira letra indicaria a combinação para os três polimorfismos no éxon 1 (Alelo A/0). Foram considerados os níveis de produção de MBL descritos na Tabela 9.

**Tabela 8** - Iniciadores para genotipagem do gene *MBL2*.

Iniciadores	Sequência	Tamanho do fragmento esperado
Éxon 1	Forward: AGGCATCAACGGCTTCCCA Reverse: AGAACAGCCCAACACGTACCT	90 pb
H/L	Forward-C: TGCTTCCCCTTGGTGTTTTAC Forward-G: TGCTTCCCCTTGGTGTTTTAG Reverse: GCCAGGGCCAACGTAGTAAG	78 pb
X/Y	Forward-C: TGGAAGACTATAAACATGCTTTCC Forward-G: TGGAAGACTATAAACATGCTTTCCG Reverse: CCGAAGAGGACATGGAGAGA	151 pb

**Tabela 9** - Níveis de produção de MBL funcional segundo a presença dos genótipos para o gene *MBL2*.

Níveis de MBL	Genótipos
Alto	HYA/HYA, HYA/LYA, LYA/LYA
Intermediário	HYA/LXA, HYA/HYO, HYA/LYO, LYA/LXA, LYA/LYO, LXA/LXA, LXA/LYO
Baixo	HYO/LYO, HYO/HYO, HYO/LXA, LYO/LYO, LYO/LXO

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. As informações dos grupos caso e controle foram submetidos à análise estatística, realizada pelo Mann-Whitney (índices hematimétricos e parâmetros bioquímicos), Teste de  $X^2$  e Teste exato de Fisher (para ensaios moleculares).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 PACIENTES E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES

Após a análise documental, foram verificados 121 pacientes que atendiam aos critérios de inclusão anteriormente descritos. Dentre aqueles contatados e que cujas lesões ainda estavam em curso, 30 concordaram em participar deste trabalho. Além destes, participaram também outros 60 pacientes com anemia falciforme, mas sem histórico de UMIs. Todos os pacientes assinaram o TCLE.

O grupo formado por pacientes com anemia falciforme e com UMIs foi composto por indivíduos adultos, sendo 12 do sexo feminino e 18 do sexo masculino, com média de idade de 37 anos (20 – 54 anos) e o grupo composto por pacientes com anemia falciforme sem UMIs foi composto por 29 mulheres e 31 homens, com média de idade de 39 anos (19 – 56 anos). As úlceras, por sua vez, apresentavam tempo médio de duração de 34,2 meses (7 – 240 meses) e estavam distribuídas nos sujeitos da pesquisa da seguinte forma: 20 (67%) apresentavam apenas uma única lesão, 9 (30%) duas lesões e 1 (3%) três lesões.

Quanto à extensão das UMIs verificadas nos voluntários observou-se grande variação ( 0,3 cm<sup>2</sup> a 300 cm<sup>2</sup>) com área média de dano tecidual de 27,5 cm<sup>2</sup>.

As lesões verificadas exibiam tamanho variável, margens definidas, bordas irregulares, presença de exsudato abundante, tecido necrótico, celulite e base com tecido de granulação e ainda odor fétido. As regiões perilesionais

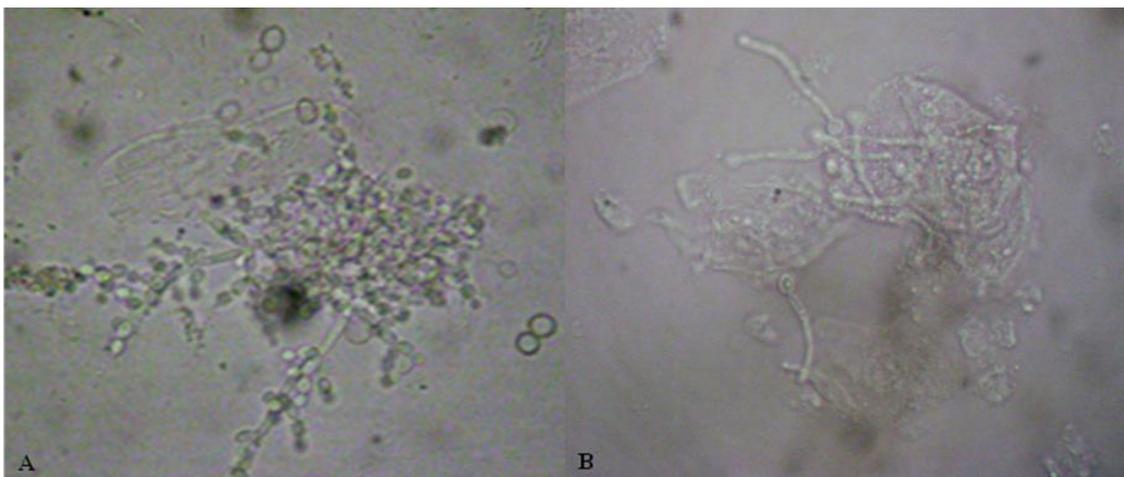
se apresentavam hiperkeratóticas com perda de tecido subcutâneo e dos folículos pilosos e com hemossiderose (Figura 2).



**Figura 2** - Úlcera de Membro Inferior Esquerdo circunferencial, médio-lateral, ocupando 2/3 inferiores da perna, com bordos irregulares e áreas de hemossiderose perilesionais. Pode-se observar ainda a presença de tecido de granulação irregular e exsudato difuso de coloração amarelo-esbranquiçado.

## 5.2 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS

A partir das 41 amostras clínicas obtidas dos 30 pacientes com anemia falciforme, foram visualizadas ao exame direto bactérias em 37, sendo em 34 detectada grande quantidade de cocos e bacilos, e em três havia raros cocos. Destas 37 amostras em sete também foram observadas estruturas fúngicas em parasitismo como células de leveduras ovais, hialinas e brotantes, pseudomicélio e micélio verdadeiro (Figura 3A e 3B).



**Figura 3 - A** – Exame direto de amostra de secreção obtida de úlcera de membro inferior evidenciando células de leveduras brotantes, ovais e hialinas e presença de pseudohifas, além de bactérias; **B** – Presença de filamentos hialinos.

Das 37 amostras clínicas foram isoladas bactérias gram positivas e gram negativas todas identificadas pelo sistema automatizado VITEK 2 (Tabela 10).

**Tabela 10** – Bactérias isoladas a partir de secreção de úlceras de membros inferiores de pacientes com anemia falciforme.

Espécies identificadas	Número de isolados
<i>Staphylococcus aureus</i>	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
<i>P. stutzeri</i>	3
<i>Proteus vulgaris</i>	3
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>P. mirabilis</i>	1
<i>P. mendocina</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
Total	59

Ainda em nove destas amostras foram isoladas leveduras identificadas com base na taxonomia clássica e método automatizado verificando prevalência de leveduras do complexo *Candida haemulonii* com quatro isolados, seguida por *C. albicans* (2), *C. guilliermondii* (2) e *C. parapsilosis* (1).

Em nossa pesquisa, os isolados de *Candida* identificados por taxonomia clássica e VITEK foram diferenciados por meio de técnicas moleculares. Os

isolados originalmente identificados como *C. haemulonii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. albicans* após o sequenciamento gênico foram identificados conforme Tabela 11.

**Tabela 11** – Espécies de *Candida* isoladas em úlceras de membros inferiores de pacientes com anemia falciforme acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação Hemope (HEMOPE).

<b>Espécies identificadas</b>	<b>Número de isolados</b>
<i>Candida duobushaemulonii</i>	4
<i>C. albicans</i>	2
<i>C. guilliermondii</i>	2
<i>C. parapsilosis</i>	1

A partir do exame direto e cultura foram verificadas nas 34 amostras clínicas das de 25 pacientes, 25 casos de bacteriose. Em três UMIs provenientes de três pacientes foram verificados apenas casos de colonização por *Staphylococcus aureus*. Em sete casos ocorreu infecção mista (28%), ou seja, bacteriose associada à micose por leveduras do gênero *Candida*. Não foi diagnosticada infecção microbiológica em quatro UMIs de dois pacientes.

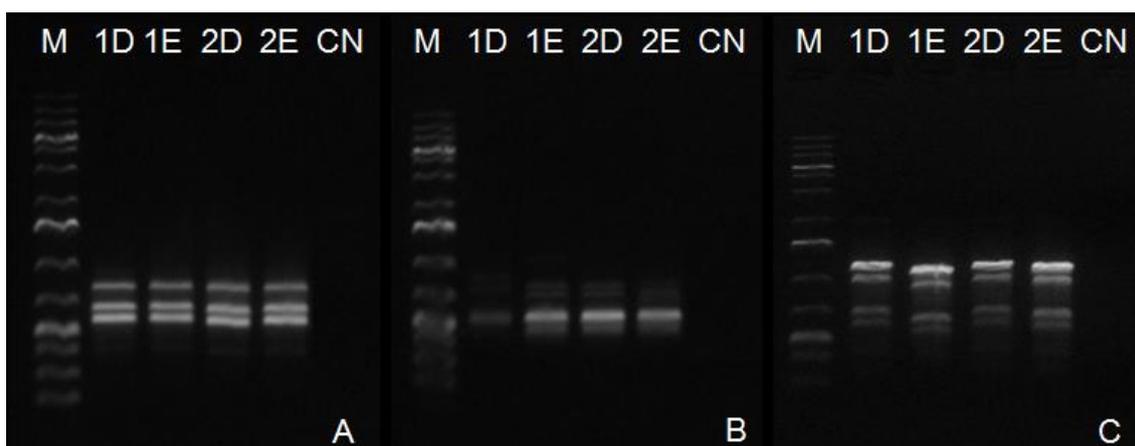
Assim, dos 30 pacientes foram diagnosticados 25 casos de infecção em UMIs o que implica numa incidência aproximada de 83%. Por meio do diagnóstico microbiológico foram obtidos 68 isolados, distribuídos conforme Tabela 12.

**Tabela 12** - Número de micro-organismos isolados em úlceras de membros inferiores de pacientes acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação Hemope (HEMOPE).

	<b>UMIs infectadas (n=34)</b>	<b>UMIs não infectadas (n=7)</b>
<b>Número de pacientes</b>	25	5
<b>Número de isolados</b>	65	3
<b>Número total de espécies isoladas</b>	14	1
<b>Média de isolados por UMI</b>	1,91	0,42

### 5.2.1 Análise de similaridade genética entre isolados de *Candida duobushaemulonii*

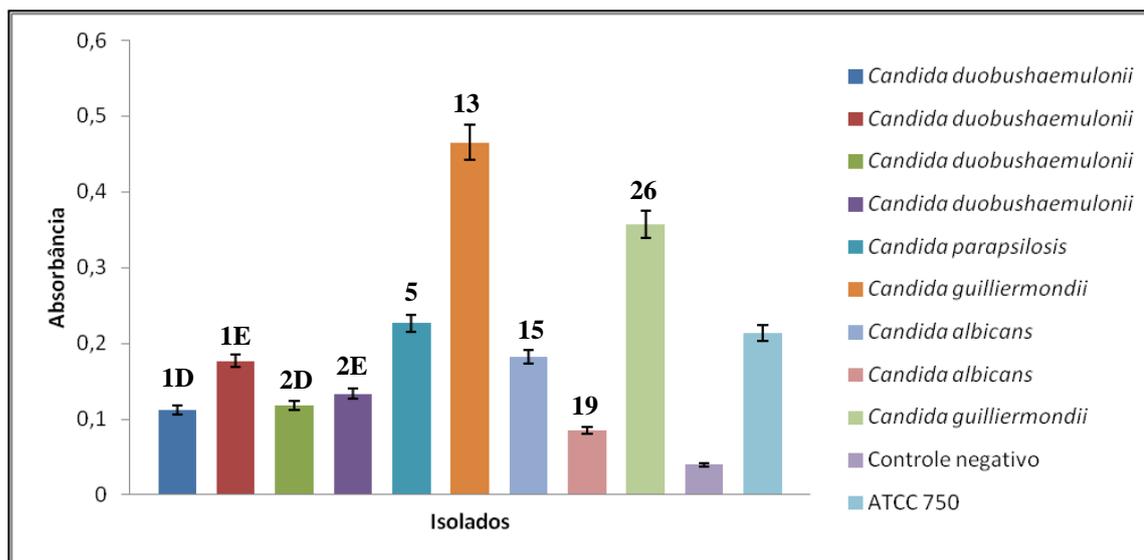
Foram submetidos à análise molecular por ISSR quatro isolados de *C. duobushaemulonii* provenientes de amostras de UMIs de pacientes com anemia falciforme internados na mesma enfermaria do Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE. A análise genética mostrou que os quatro isolados apresentaram 100% de semelhança quanto ao padrão de fragmentos gerados para os marcadores GACA<sub>4</sub>, GTG<sub>5</sub> e M13 (Figura 4).



**Figura 4** - Perfis de amplificação de regiões ISSR de isolados de *Candida duobushaemulonii* utilizando os iniciadores GACA4 (A), GTG5 (B) e M13 (C). M: Marcador de pares de base 10kb; 1 e 2: Isolados de *C. duobushaemulonii* provenientes de pacientes com anemia falciforme; D e E: representando UMI direito e esquerdo; CN: controle negativo.

### 5.2.2 Caracterização dos agentes etiológicos quanto a capacidade de produzir biofilme

Dos nove isolados de *Candida* considerados agentes etiológicos em condição de infecção mista, todos formaram biofilme, sendo nos dois isolados de *C. guilliermondii* verificada forte formação de agregados celulares (Figura 5), nas demais espécies houve variação na formação de biofilme.



**Figura 5** - Formação de biofilme com diferentes intensidades expressas por espécies de *Candida* isoladas a partir de UMIs de pacientes com anemia falciforme acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação Hemope (HEMOPE).

### 5.2.3 Susceptibilidade antifúngica *in vitro*

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos nove isolados de *Candida* frente a seis antifúngicos comerciais anfotericina B, anidulafungina, fluconazol, voriconazol, cetoconazol e ciclopirox olamina, foram avaliadas segundo a metodologia de microdiluição em caldo.

As CIMs dos agentes etiológicos à anfotericina B, anidulafungina, azólicos e coclopirox olamina estão demonstradas na Tabela 13. Todos os isolados, exceto os de *C. duobushaemulonii*, foram sensíveis a anfotericina B.

No que se refere ao voriconazol, as espécies *C. parapsilosis* e um isolado de *C. guilliermondii* (26) apresentaram sensibilidade dose-dependente. Todos os isolados foram sensíveis à anidulafungina e à ciclopirox olamina. Dois isolados de *C. albicans* e um de *C. guilliermondii* (13) foram sensíveis a todos os antifúngicos testados.

**Tabela 13** - Concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados de *Candida* provenientes de UMIs de pacientes com anemia falciforme acompanhados no Hospital de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE) frente à drogas antifúngicas baseado no CLSI (2008) e (2012).

Registro	Espécie	Anfo B	Ani	Fluco	Vori	Ceto	Ciclo
µg/ml							
1D	<i>C. duobushaemulonii</i>	4	0,03	64	16	0,5	0,5
1E	<i>C. duobushaemulonii</i>	4	0,03	64	16	0,5	0,5
2D	<i>C. duobushaemulonii</i>	4	0,03	64	16	0,5	0,5
2E	<i>C. duobushaemulonii</i>	4	0,03	64	16	0,5	0,5
5	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,5	1	0,5	0,125	0,125
13	<i>C. guilliermondii</i>	0,125	0,5	4	1	0,125	0,125
15	<i>C. albicans</i>	0,125	0,01	0,25	0,125	0,06	0,06
19	<i>C. albicans</i>	0,125	0,01	0,25	0,125	0,06	0,06
26	<i>C. guilliermondii</i>	0,125	0,5	8	2	0,125	0,25

\*Anf B – Anfotericina B; Ani – Anidulafungina; Fluco – Fluconazol; Vori – Voriconazol; Ceto – Cetoconazol; Ciclo – Ciclopirox olamina.

### 5.3 CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Os resultados obtidos ao comparar as características hematológicas e bioquímicas de pacientes com anemia falciforme, divididos em grupos com e sem UMIs, permitem observar que o grupo que apresentava lesão de membro inferior é composto por indivíduos que possuem menores níveis de hemoglobina basal ( $p= 0,001$ ), hematócrito ( $p= 0,004$ ), reticulócitos ( $p= 0,031$ ) e hemoglobina fetal ( $p= 0,021$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Comparação dos dados hematológicos e bioquímicos dos pacientes portadores de AF com e sem UMIs.

	Pacientes com UMIs (n=30)	Pacientes sem UMIs (n=60)	*p – value
Hb (g/dL)	7,6 ± 1,0	8 ± 1,0	0,001
Ht (%)	22,9 ± 3,1	24,5 ± 3,5	0,004
Ret (%)	7,5 ± 1,9	9,5 ± 4,1	0,031
Hb F (%)	5,4 ± 3,1	8,1 ± 5,2	0,021
Hb S (%)	91,6 ± 3,0	89,5 ± 5,1	0,094
AST	50,2 ± 28,1	45,7 ± 18,4	0,672
BT (mg/dL)	3,3 ± 1,4	3,1 ± 2,4	0,596
BI (mg/dL)	3,1 ± 1,2	4,0 ± 7,8	0,647
LDH (U/L)	931,4 ± 533,4	639,1 ± 228,1	0,847

Hb: hemoglobina; Ht: Hematócrito; Ret: Reticulócitos; HbF: Hemoglobina Fetal; HbS: Hemoglobina S \*Mann Whitney Test

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS $\beta^S$

Entre os 180 cromossomos analisados, foram identificados três haplótipos e não se observou a presença dos haplótipos Camarões e Senegal. Os resultados para as frequências haplotípicas verificados são mostrados na Tabela 15.

**Tabela 15** - Distribuição dos Alelos  $\beta^S$  entre os casos (60 alelos) e controles (120 alelos).

Haplótipos $\beta^S$	Pacientes com UMIs (n = 60)	Pacientes sem UMIs (n = 120)
<b>CAR</b>	48 (80%)	90 (75%)
<b>Benin</b>	8 (13,3%)	21 (17,5%)
<b>Atípico</b>	3 (5%)	9 (7,5%)
<b>Saudi</b>	1 (1,66%)	0 (0%)

Teste de  $\chi^2$  p = 0,40

O haplótipo CAR apresentou frequência de 76%, seguido por Benin (16%) e Saudi (0,05%). Os 7,95% restantes, correspondem aos considerados atípicos.

O genótipo HBB\*S foi determinado em 90 pacientes com anemia falciforme, sendo 30 com UMIs (casos) e 60 sem histórico de lesão (controles).

A Tabela 16 mostra as combinações haplotípicas do gene  $\beta^S$  e ausência de significância estatística ( $p = 0,42$ ).

**Tabela 16** - Genótipo  $\beta^S$  dos 90 pacientes estudados.

Genótipo	Casos (n=30)	Controles (n=60)
CAR / CAR	19 (63,4)	31 (51,7%)
CAR / Benin	7 (23,3%)	19 (31,7%)
CAR / Atípico	3 (10%)	9 (15%)
Benin/Benin	0 (0%)	1 (1,6%)
Benin / Saudi	1 (3,3%)	0 (0%)

Teste de  $\chi^2$  ( $p = 0,42$ )

Também foi verificada possível correlação entre o genótipo CAR/CAR e o desenvolvimento de UMIs quando comparado aos demais genótipos. Os dados obtidos mostraram ausência de significância estatística ( $p = 0,36$ ), como mostrado na Tabela 17.

**Tabela 17** - Comparação entre o genótipo CAR/CAR e os demais genótipos  $\beta^S$  nos grupos de pacientes com e sem úlceras de membros inferiores.

Combinação haplotípica	Pacientes com UMIs	Pacientes sem UMIs
CAR/CAR	19 (63%)	31 (52%)
Não CAR/CAR	11 (37%)	29 (48%)
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>60</b>

Teste exato de Fisher ( $p = 0,36$ )

## 5.5 POLIMORFISMO DO GENE *MBL2*

Como resultado, verificou-se que o grupo de pacientes com UMIs e controle estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nos pacientes com UMIs, as frequências dos alelos H e L na região promotora (-550) foram de 0,28 e 0,72, respectivamente. As frequências dos alelos Y e X na região promotora (-221) foram 0,83 e 0,17 respectivamente. Por fim, as frequências dos alelos A e O do éxon 1 foram 0,72 e 0,28, respectivamente. Na população de pacientes

com anemia falciforme sem UMIs as frequências encontradas foram: 0,3 (H); 0,7 (L); 0,82 (Y); 0,18 (X); 0,78 (A) e 0,22 (O) (Tabela 18).

As frequências alélicas de H/L, X/Y e A/O não diferiram de maneira estatisticamente significativa ( $p = 0,86$ ;  $p = 0,83$  e  $p = 0,35$ , respectivamente) entre os grupos analisados.

A distribuição da frequência dos genótipos variantes da região promotora -550 (HL/LL), -221 (YX/XX) e do éxon 1 (AO/OO) do gene *MBL2* em pacientes com anemia falciforme nos grupos com e sem UMIs não mostraram diferença significativa ( $p = 0,85$ ;  $p = 0,58$  e  $p = 0,56$ , respectivamente) (Tabela 18).

**Tabela 18** - Frequências de genótipos e alelos relacionados à polimorfismos da região promotora (-550 e -221) e éxon 1 do gene *MBL2* em portadores de anemia falciforme com e sem úlceras de membro inferior atendidos no HEMOPE.

Região do gene <i>MBL2</i>	Total	Pacientes com UMIs	Pacientes sem UMIs	<i>p</i> – value (Teste exato de Fisher)
	90	30	60	
-550				
Genótipo - N (%)*				
HH	8 (8,9)	2 (6,6)	6 (10)	
HL	37 (41,1)	13 (43,4)	24 (40)	0,85
LL	45(50)	15 (50)	30 (60)	
Alelo - %**				
H	29,4	28,4	30	0,86
L	70,6	71,6	70	
-221				
Genótipo - N (%)*				
XX	2 (2,2)	0 (0)	2 (3,3)	
XY	28 (31,1)	10 (33,3)	18 (30)	0,58
YY	60 (66,7)	20 (66,7)	40 (66,7)	
Alelo - %**				
X	17,8	16,7	18,4	0,83
Y	82,2	83,3	81,6	
Genótipo - N (%)*				
AA	55(61)	17 (56,6)	38 (63)	
AO	27 (30)	9 (30)	18 (30)	0,56
OO	8 (8,9)	4 (13,3)	4 (6,7)	
Alelo - %**				
A	76,1	71,6	78,4	0,35
O	23,9	28,4	21,6	

\*Teste  $\chi^2$  \*\*Teste exato de Fisher

As frequências dos haplótipos relacionados a níveis de produção de MBL considerados alto (HYA/HYA, HYA/LYA e LYA/LYA), intermediário (HYA/LXA, HYA/HYO, HYA/LYO, LYA/LXA, LYA/LYO, LXA/LXA e LXA/LYO) e baixo (HYO/LYO, HYO/HYO, HYO/LXA, LYO/LYO e LYO/LXO) foram 0,34; 0,43 e 0,27, respectivamente, para o grupo com UMIs e 0,38; 0,48 e 0,14, respectivamente, para o grupo sem UMIs.

A associação dos haplótipos que determinam alta e intermediária/baixa produção de MBL com o desenvolvimento de UMIs não apresentou significância estatística (Tabela 19).

**Tabela 19** - Haplótipos do gene *MBL2* correlacionados com níveis séricos de MBL em pacientes com anemia falciforme com e sem UMIs atendidos no HEMOPE.

Perfil genotípico do <i>MBL2</i>	Total (n =90 )	Pacientes com UMIs (n = 30)	Pacientes sem UMIs (n = 60)	<i>p</i> – value (Teste exato de Fisher)
Alto	47	10	37	0,643
Baixo / Intermediário	43	20	23	

Assim, nos propusemos a avaliar a possível associação entre polimorfismo da região promotora (-550 e -220) e éxon 1 do gene *MBL2* e o aumento da susceptibilidade a infecções em UMIs de pacientes com anemia falciforme. Para o grupo de pacientes sem infecção, as frequências dos alelos da posição -550 da região promotora foram de 0,20 (alelo H) e 0,80 (alelo L), para os alelos da posição -220 foram 0,20 (alelo X) e 0,80 (alelo Y) e para os alelos A e O do éxon 1 foram 0,70 e 0,30, respectivamente. No grupo de pacientes com infecção, as frequências foram: 0,30 (H); 0,70 (L); 0,16 (X); 0,84 (Y) e 0,72 (A); 0,28 (O).

Quando comparados os resultados obtidos tanto para as frequências dos alelos H/L, X/Y e A/O ( $p = 0,70$ ;  $p = 0,66$  e  $p = 1$ , respectivamente) quanto para as distribuições dos genótipos do polimorfismo, não foi verificada qualquer diferença estatisticamente significativa (Tabela 20).

**Tabela 20** - Frequências de genótipos e alelos relacionados a região promotora (-550 e -221) e éxon 1 de polimorfismos do gene *MBL2* em pacientes com anemia falciforme atendidos no HEMOPE.

Região do gene <i>MBL2</i>	Total	Não infectados	Infectados	<i>p</i> - value (Teste exato de Fisher)
	30	5	25	
-550				
Genótipo - N (%)*				
HH	2 (6,6)	0 (0)	2 (8)	0,76
HL	13 (43,4)	2 (40)	11 (44)	
LL	15 (50)	3 (60)	12 (48)	
Alelo - %**				
H	28,4	20	30	0,70
L	71,6	80	70	
-221				
Genótipo - N (%)*				
XX	0 (0)	0 (0)	0 (0)	***
XY	10 (33,3)	2 (40)	8 (32)	
YY	20 (66,7)	3 (60)	17 (68)	
Alelo - %**				
X	16,7	20	16	0,66
Y	83,3	80	84	
Genótipo - N (%)*				
AA	17 (56,6)	2 (40)	15 (60)	0,23
AO	9 (30)	3 (60)	6 (24)	
OO	4 (13,3)	0 (0)	4 (16)	
Alelo - %**				
A	71,6	70	72	1,0
O	28,4	30	28	

\*Teste  $\chi^2$  \*\*Teste exato de Fisher \*\*\* teste inválido

Os haplótipos mais freqüentes foram LYA/LYA (16,6%), LYA/LXA e HYA/LXA com 13,3% cada. As frequências dos haplótipos relacionados a níveis de produção de MBL considerados alto, intermediário e baixo foram 0,34; 0,43 e 0,27, respectivamente.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho mostraram não haver associação estatisticamente significativa entre os as infecções obsevas nas

UMIs dos sujeitos da pesquisa e o polimorfismo do gene *MBL2*, conforme Tabela 21.

**Tabela 21** – Haplótipos do gene *MBL2* correlacionados com níveis séricos de MBL em pacientes com anemia falciforme atendidos no HEMOPE.

<b>Perfil genotípico do <i>MBL2</i></b>	<b>Total (n = 30)</b>	<b>Sem infecção (n = 5)</b>	<b>Com infecção (n = 25)</b>	<b><i>p</i> – value (Teste exato de Fisher)</b>
<b>Alto</b>	10	1	9	0,62
<b>Baixo / Intermediário</b>	20	4	16	

## 6. DISCUSSÃO

No mundo, a anemia falciforme pode ser considerada uma doença negligenciada, especialmente na escassez de recursos terapêuticos (Santos *et al.*, 2012). Entretanto, o Brasil vem se destacando nos cuidados relativos às morbidades associadas a essa doença, tratando-a como problema de saúde pública ao promover sua inclusão no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), através da Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde.

Adequado a esta realidade, o HEMOPE possui registro de cerca de 1500 pacientes portadores de doenças falciformes. Destes, aproximadamente 1200 têm anemia falciforme, HbSS (CID D57.0, D57.1), tendo sido selecionados para esta pesquisa inicialmente aqueles que apresentavam histórico de UMI, conforme seus prontuários.

De maneira semelhante à composição do grupo de voluntários desta pesquisa, considerando o gênero, o sexo masculino é apontado pela literatura como aquele com maior incidência de UMIs dentre pacientes com anemia falciforme (Powars *et al.*, 2005; Paladino, 2010; Ladizinski *et al.*, 2012). Já quanto à idade a prevalência varia, sendo mais comum o surgimento de UMIs em pacientes com anemia falciforme acima dos 20 anos (Ladizinski *et al.*, 2012). Ainda, Halabi-Tawil *et al.* (2008), verificaram que os pacientes com anemia falciforme atendidos em hospital universitário em Paris apresentavam lesões nas pernas com tempo médio de duração de 29,5 meses.

As úlceras de membros inferiores estão entre as complicações cutâneas mais frequentes nos pacientes com anemia falciforme. Embora as taxas de sobrevivência destes pacientes tenham aumentado nas últimas quatro décadas, a gestão de co-morbidades, tais como as UMIs, permanece um desafio. As lesões apresentam um significativo impacto psicológico, social e econômico devido à sua natureza recorrente e ao longo intervalo de tempo até que ocorra cicatrização (Meneses *et al.*, 2010)

As áreas de dano tecidual das UMIs verificadas nos voluntários teve grande amplitude, variando de 0,3 cm<sup>2</sup> a 300 cm<sup>2</sup>, com área média de 27,5 cm<sup>2</sup>. Halabi-Tawil *et al.* (2008) relataram lesões em membros inferiores de pacientes com anemia falciforme cujas áreas variavam de 1,21 cm<sup>2</sup> a 181 cm<sup>2</sup>,

com média de 12 cm<sup>2</sup> e, também nesse sentido, Minniti *et al.* (2014) observaram úlceras com área média de 4,1 cm<sup>2</sup>. Segundo Serjeant *et al.* (2005), as UMIs, a despeito de mais frequentemente apresentarem áreas pequenas ou médias, abaixo dos 80 cm<sup>2</sup>, podem acometer áreas maiores localizadas entre o tornozelo e o joelho, mostrando a grande variabilidade da extensão das feridas.

Com base em achados semelhantes aos descritos nesta pesquisa, Meneses *et al.* (2010) afirmam que as UMIs em pacientes com anemia falciforme são de tamanho variável, margens definidas, bordas em relevo e base com tecido em granulação, sendo resistentes à terapia. Os autores argumentam também que, no início, o tecido vizinho à lesão pode ser saudável e, posteriormente, apresenta hiperpigmentação, hiperqueratose, perda de tecido subcutâneo e folículos pilosos, gerando dermatose perilesional.

É importante observar que as UMIs apresentam processo de cicatrização lento, podendo durar de alguns meses a vários anos. Uma dos fatores que contribui para este atraso na cura é a conhecida contaminação por uma ampla variedade de micro-organismos endógenos de origem fecal, oral ou cutânea (Bowler *et al.*, 1999; (Ladizinski *et al.*, 2012).

Neste trabalho foram diagnosticados 25 casos de infecção em UMIs nos pacientes com anemia falciforme, o que implica numa incidência aproximada de 83%. Os resultados obtido por Halabi-Tawil *et al.* (2007) em pacientes com anemia falciforme foram semelhantes, com incidência de 85%, verificando infecção em úlceras de 17 pacientes dentre 20 analisados.

Dentre os 68 isolados obtidos neste trabalho por meio do diagnóstico microbiológico, não foram detectados quaisquer micro-organismos anaeróbios obrigatórios.

Em estudo realizado considerando 74 UMIs de diferentes etiologias, Bowler *et al.* (1999) detectaram 330 isolados, sendo 220 provenientes de 44 feridas infectadas e 110 de 30 feridas não infectadas. A diversidade de isolados aeróbios e anaeróbios encontrada por estes autores foi expressiva, ocorrendo 52 espécies (28 aeróbios e 24 anaeróbios) em lesões infectadas e 33 espécies (20 aeróbios e 13 anaeróbios) apenas colonizando as feridas.

Assim, as médias de isolados por lesão foram de 2,5 e 1,8 naquelas infectadas e não infectadas, respectivamente.

O grande número de micro-organismos encontrado por Bowler *et al.* (1999), principalmente aqueles anaeróbios obrigatórios, parece estar relacionado aos tipos de meios de cultura utilizados por estes autores – Meios Ágar Tripton de Soja (TSA), MacConkey, Ágar para Anaeróbios Fastidiosos suplementado com sangue de cavalo (BFAA), BFAA suplementado com ácido nalidixico e Tween 80%, BFAA suplementado com ácido nalidixico e vancomicina, BFAA suplementado com neomicina, Ágar Veillonella suplementado com vancomicina e Ágar Rogosa – quando comparados aos utilizados neste trabalho – Meios Ágar Sangue, MacConkey e Chocolate.

Esse argumento é reforçado pelos achados de Chellan *et al.* (2010) que, analisando possíveis infecções em UMIs de pacientes com diabetes tipo II, utilizaram meios de cultura Ágar MacConkey e Ágar Sangue. Como resultado, obtiveram média de 1,5 isolados microbianos por ferida e ausência de anaeróbios obrigatórios.

Por sua vez, Frank *et al.* (2009) realizaram estudo de feridas crônicas quanto à natureza das infecções por meio de dois métodos de coleta (*swab* e biopsia) e verificaram que, a depender do método de coleta, há interferência no número e perfil dos isolados. Mesmo tendo sido identificados os mesmos micro-organismos, nas amostras obtidas por meio de *swab* foram detectados 1023 isolados enquanto que no mesmo número de amostras de biopsias, 1630. A diferença se deu em função da maior quantidade de anaeróbios obrigatórios detectados a partir de tecidos profundos das lesões. Em nosso trabalho, o método de coleta se deu por meio de *swab*, sendo, possivelmente, inadequado para pesquisa de anaeróbios obrigatórios.

Os patógenos bacterianos prevalentes nesta pesquisa foram *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. De maneira semelhante, em um estudo realizado na Jamaica em UMIs de pacientes com anemia falciforme, Serjeant *et al.* (2005) encontraram predominantemente infecções polimicrobianas com maior incidência das bactérias aeróbias *Staphylococcus aureus* (51%), *Pseudomonas aeruginosa* (51%) e estreptococos beta-hemolíticos (40%) nas 80 úlceras analisadas.

Vicentin *et al.* (2008), analisando UMIs em pacientes usuários de bota de Unna, encontraram 121 isolados correspondentes a 19 espécies e 10 gêneros, sendo que aqueles com maior prevalência nas culturas foram *Pseudomonas* (34%), *Staphylococcus* (28,09%) e *Enterococcus* (23,14%), seguidos dos demais gêneros: *Serratia* (4,12%), *Morganella* (3,3%), *Proteus* (2,47%), *Escherichia* (1,65%), *Citrobacter* (1,65%), *Enterobacter* (0,82%) e *Providencia* (0,82%).

Ainda, Dowd *et al.* (2009), utilizando técnica de identificação molecular, verificaram ampla diversidade bacteriana em úlceras crônicas de pé de pacientes diabéticos. Os gêneros de bactérias mais prevalentes foram *Staphylococcus*, *Peptoniphilus*, *Pseudomonas*, *Anaerococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Finnegoldia*, e *Clostridium* spp.

De maneira geral, os resultados obtidos nesta pesquisa estão em consonância com a literatura, mostrando que as bactérias prevalentes nas UMIs são provenientes do meio ambiente ou da pele e/ou membranas mucosas, sendo, conforme Gome (2001), de suma importância a lavagem de mãos dos profissionais de saúde ao lidar com cada paciente, com o objetivo de auxiliar no controle de disseminação das infecções.

Também em úlceras de pé de pacientes diabéticos, por meio de método molecular, Redel *et al.* (2013) demonstraram a influência do meio ambiente no perfil das infecções das lesões. Eles verificaram que em UMIs de indivíduos com microbiotas similares, mas expostos a ambientes diferentes, foram encontrados agentes infecciosos diferentes.

Além de bactérias, também foi verificada neste trabalho forte presença de leveduras. Com base na observação de estruturas fúngicas em parasitismo (psedomicélio e filamento) e na quantidade de células de levedura, foi verificado que todos os fungos detectados estavam infectando as UMIs. O gênero *Candida*, único encontrado, correspondeu a 13,8% de todos os microorganismos identificados e estava presente em 28% dos pacientes infectados. Dados semelhantes foram observados por Chellan *et al.* (2010), cuja presença de fungos se deu em 27,2% (141 casos em 518 pacientes) das feridas de pacientes com diabetes tipo II.

Incidência menor foi encontrada por Minaric-Missoni *et al.* (2005) que identificaram 22 (4,3%) casos de infecção pelo gênero *Candida* em 509 pacientes diabéticos com lesões no pé e por Saaiq; Ahmad; Zaib (2015) que em 95 pacientes queimados isolaram *Candida* em 4 (3,92%).

Dentre as leveduras detectadas neste trabalho, é importante ressaltar a presença de uma levedura rara que pode ser isolada de espécimes clínicos humanos pertencente ao complexo *C. haemulonii*, a *C. duobushaemulonii*. Esta levedura pertencente ao grupo II do complexo *C. haemulonii* e tem sido associada a casos de fungemia relacionadas ao uso de cateteres, osteítes, epidemias neonatais em unidades de terapia intensiva e infecções em úlceras de pé em pacientes diabéticos (Cendejas-Bueno *et al.*, 2012; Almeida-Junior *et al.*, 2012).

Por se tratar de uma levedura de ocorrência rara e, considerando que os pacientes se encontravam internados na mesma enfermaria, foram utilizados métodos epidemiológicos moleculares para demonstrar a possível relação clonal entre os isolados obtidos das diferentes lesões. Nossos resultados sugerem que os quatro isolados de *C. duobushaemulonii* indicam origem clonal, possivelmente decorrente da manipulação dos funcionários dos serviços de saúde ou dos propágulos fúngicos dispersos no ar ambiente.

Silva *et al.* (2013) desenvolveram raciocínio semelhante ao analisar possível origem clonal de cinco isolados de *C. peliculosa* em neonatos hospitalizados em unidade de terapia intensiva. Os autores avaliaram a similaridade genética, como nesta pesquisa, por meio da amplificação da região ISSR utilizando apenas os marcadores GTG<sub>5</sub> e M13 e concluíram que quatro isolados apresentavam a mesma origem clonal.

O potencial para formação de biofilme dos isolados fúngicos identificados foi avaliado por meio da análise de formação de biofilme em superfície de poliestireno e dois isolados de *C. guilliermondii* foram os maiores produtores.

Por meio do método de coloração por cristal de violeta foi verificada variação do valor de absorbância entre os nove isolados de 0,084 a 0,465, representando 5,4 vezes a diferença entre o maior e o menor produtor de

biofilme, sendo *C. albicans* o isolado que produziu menor quantidade de biofilme.

Os biofilmes constituem uma população de micro-organismos ligados uns aos outros, que podem se aderir a uma superfície biótica ou abiótica, rodeada por uma matriz extracelular. Essas estruturas tendem a reduzir a eficácia da terapia antifúngica, dificultando o tratamento (Ramage *et al.*, 2012).

Alguns estudos (Gácsér *et al.*, 2007; Orsi *et al.*, 2010) tem relatado que a formação de biofilme desempenha papel relevante nas infecções causadas por *C. parapsilosis*, sendo produzido por cerca de 39% dos isolados desta espécie presentes em lesões de pele (Ruzicka *et al.*, 2007).

Silva *et al.* (2009) demonstraram que *C. parapsilosis* é uma das espécies de *Candida* não-*albicans* com maior habilidade de produção de biofilme. Todavia, em nosso estudo, dois isolados de *C. guilliermondii* foram os maiores produtores de biofilme, seguidos por *C. parapsilosis* e *C. duobushaemulonii*. Sabe-se que *C. guilliermondii* apresenta concentração inibitória mínima relativamente elevada para equinocandinas (Simitsopoulou *et al.*, 2014). Assim os isolados com boa capacidade de produção de biofilme, como os deste trabalho, podem gerar grande dificuldade de resposta ao tratamento, especialmente quando associados às bactérias como ocorreu com os pacientes envolvidos.

Ainda quanto a formação de biofilme, os resultados obtidos por Cendejas-Bueno *et al.* (2012), diferente dos obtidos nesta pesquisa, mostraram que as leveduras do complexo *C. haemulonii* foram fracas produtoras de biofilme. Em contrapartida, Oh *et al.* (2011) relataram espécies deste complexo obtidas a partir de culturas de sangue como sendo boas produtoras e argumentam que parece haver relação entre o grau de produção de biofilme com o sítio de origem dos isolados das leveduras do complexo *C. haemulonii*.

No que se refere à determinação da atividade antifúngica, neste trabalho foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos nove isolados obtidos a partir de UMIs de pacientes com anemia falciforme frente a seis antifúngicos (anfotericina B, anidulafungina, fluconazol, voriconazol, cetoconazol e ciclopirox olamina), segundo a metodologia de microdiluição em caldo.

O perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *C. duobshaemulonii* mostrado na Tabela 13 está em acordo com o previamente relatado por Cendejas-Bueno *et al.* (2012), onde todos os isolados obtidos apresentaram resistência às drogas anfotericina B, fluconazol, voriconazol. Estes autores relatam ainda, em estudo com 30 isolados do complexo *C. haemulonii*, que 28 amostras poderiam ser consideradas resistentes de forma cruzada para azóis, como mostraram também nossos resultados.

Ainda a sensibilidade dos isolados de *C. duobshaemulonii* a anidulafungina foi condizente com os achados de Ruan *et al.* (2010), que cita além desta, a micafungina como agentes de grande valia para terapia empírica em infecções pelo complexo *C. haemulonii*. Da mesma forma, os demais isolados destes autores foram sensíveis a esta droga. As equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) são lipopeptídeos que inibem a síntese de glucano, que é responsável pela biossíntese do  $\beta$ -1,3-D-glucano, maior componente estrutural da parede celular dos fungos. Essas drogas demonstram atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida* e são efetivas contra leveduras resistentes aos azóis e formadoras de biofilme (Montagna *et al.*, 2015).

Todos os isolados foram ainda sensíveis a ciclopirox olamina, apresentando concentração fungicida  $\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$ , estando em conformidade com os resultados obtidos por Oliveira *et al.* (2010) ao avaliar susceptibilidade da levedura *Cryptococcus* spp. a esta droga. Este agente antifúngico sintético é utilizado para o tratamento tópico, apresentando um amplo espectro de ação, inibindo aproximadamente todos os dermatófitos e leveduras clinicamente relevantes, incluindo isolados de *Candida* resistentes à azóis. Embora esta droga até o momento não tenha sido utilizada em úlceras maleolares, os resultados mostram ser uma boa opção nos casos de infecção de UMIs por espécies de *Candida*.

A susceptibilidade dose-dependente ao voriconazol verificada nos isolados 5 (*C. parapsilosis*) e 13 (*C. guilliermondii*) não está de acordo com os achados recentes de Sanchis *et al.* (2014); Marcos-Zambrano *et al.* (2014) e Huang *et al.* (2014), onde todos os isolados dessas espécies encontrados por esses autores se mostraram sensíveis ao referido antifúngico.

Em relação às características hematológicas e bioquímicas dos pacientes com anemia falciforme, pode-se observar que os pacientes com UMIs tinham baixos níveis de hemoglobina basal, hematócrito, reticulócitos e hemoglobina fetal.

A literatura mostra que os fatores de risco hematológico que podem contribuir para o desenvolvimento de UMIs incluem alta contagem de precursores eritróides, bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e reticulócitos, além de baixos níveis de hemoglobina (Cumming *et al.*, 1999; Connes *et al.*, 2013). Além disso, segundo Serjeant *et al.* (2005), o baixo nível de HbF é forte fator preditivo para o desenvolvimento de UMIs em pacientes com anemia falciforme, respaldando os dados obtidos nesta pesquisa. Também nesse sentido, Mousinho-Ribeiro *et al.* (2008) comenta que a HbF é importante fator de proteção contra fenômenos de falcização, em virtude de possuir maior afinidade pelo oxigênio.

No que se refere aos demais parâmetros hematológicos e bioquímicos cujos resultados não estão em consonância com as publicações relacionadas (Cardoso, 2005; Takahashi, 2005), cabe ressaltar que a anemia falciforme tem desenvolvimento clínico extremamente variável, caracterizado principalmente por diferentes graus de intensidade da anemia hemolítica. As repercussões dessa variabilidade são perceptíveis na expressão fenotípica da doença, sendo influenciada por interferentes que afetam a qualidade de vida como fatores genéticos, situação sócio-econômica, renda familiar, tipo de alimentação, condições de saneamento básico, assistência médica disponível (Naoum, 2000).

Ainda, como fatores genéticos que podem auxiliar na melhor compreensão da heterogeneidade clínica da anemia falciforme, destacam-se as interações com a alfa-talassemia, deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G<sup>6</sup>PD), esferocitose hereditária e os diferentes haplótipos do gene  $\beta^S$  (Cardoso, 2005; Takahashi, 2005; Muszlak *et al.*, 2015).

Alguns fatores genéticos contribuem para diversidade fenotípica observada na anemia falciforme, particularmente aqueles ligados aos genes globínicos, como os haplótipos ligados ao *cluster*  $\beta$  por, pelo menos em parte, influenciarem o nível de HbF (Powars, 1990; Zago; Pinto, 2007).

O genótipo  $HBB^*S$  foi determinado em 90 pacientes com anemia falciforme, sendo 30 com UMIs (caso) e 60 sem histórico de lesão (controle). A Tabela 14 mostra as combinações haplotípicas do gene  $\beta^S$ .

A combinação haplotípica CAR/CAR foi encontrada como a de maior incidência neste trabalho. Por outro lado, diversos são os estudos que tem mostrado CAR/Benin como sendo o genótipo mais comum no Brasil (Figueiredo *et al.*, 1996; Pante-de-souza *et al.*, 1998; Fleury, 2001; Gonçalves *et al.*, 2003; Lyra *et al.*, 2005).

Possivelmente, o resultado dissonante da literatura verificado neste trabalho pode ser explicado pela grande incidência do haplótipo CAR na população da cidade do Recife (81,1%), local de origem dos voluntários desta pesquisa, demonstrado por Bezerra *et al.* (2007).

De fato e assim como nesse trabalho, a maior parte dos estudos que tem sido publicados ao longo dos anos mostra o haplótipo CAR como o mais prevalente na população brasileira (Costa *et al.*, 1984; Zago *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 1994; Ponte-de-Sousa *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2003; Adorno *et al.*, 2004; Galiza Neto *et al.*, 2005; Cardoso; Guerreiro 2006; Fleury, 2007; Bezerra *et al.*, 2007; Adorno *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009; Cabral *et al.*, 2011; Okumura; Lobo; Bonini-Domingos, 2013).

Figueiredo *et al.* (1996), em estudo comparativo entre as características da anemia falciforme verificada no Brasil e aquela observada em outros países, analisando 85 indivíduos que apresentavam esta patologia, encontrou resultados nos quais o haplótipo CAR foi acompanhado por alta prevalência de úlceras em membros inferiores, fato este não corroborado por nossos dados.

É importante observar que a heterogeneidade clínica da anemia falciforme ainda não é completamente explicada pela coerância dos haplótipos do gene  $HBB^*S$ , hemoglobina F e  $\alpha$ -talassemia. A identificação de polimorfismos de genes que tenham impacto nos diferentes aspectos da fisiopatologia, como células de adesão, trombose, desidratação das hemácias e inflamação é de grande interesse para tentar explicar o fenótipo clínico da doença (Kutlar, 2007; Frenette *et al.*, 2007).

Nesse sentido, cabe observar que os polimorfismos do gene  $MBL2$  e do gene  $HBB^*S$  são característicos de populações africanas do sub-Saara e

apesar de estes genes estarem em cromossomos diferentes e não existir entre eles, em princípio, uma associação, o estudo de frequência do gene *MBL2* em pacientes portadores de anemia falciforme é importante para identificar genótipos que codificam níveis variáveis da proteína MBL no soro, dada a importância desta proteína no sistema imune inato e de sua implicação em doenças inflamatórias crônicas, como é o caso da anemia falciforme (Oliveira, 2007).

Foi relatado por Wilson; Thomas; Sissons (1979) que a diminuição da atividade dos componentes do sistema complemento e a alteração da atividade de opsonização no soro de pacientes com anemia falciforme estão relacionadas com a redução da eliminação de eritrócitos falcizados, promovendo eventos vaso-oclusivos.

Na população estudada, as frequências dos polimorfismos do gene *MBL2* foram similares aos encontrados por Boldt *et al.* (2006), que estudou a população indivíduos de diferentes etnias no Brasil e aos de Mendonça *et al.* (2010), estudando crianças com anemia falciforme atendidas no HEMOPE

Assim como neste trabalho, Oliveira *et al.* (2009), analisando 422 brasileiros com anemia falciforme, não encontrou diferença com significância estatística na distribuição da frequência do polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* entre grupos com e sem UMIs. Resultados semelhantes foram obtidos por Mendonça *et al.* (2010), estudando 87 crianças com anemia falciforme, assim como Neonato *et al.* (1999).

Mendonça *et al.* (2010) demonstraram associação estatisticamente significativa entre genótipos de *MBL2*, considerando alelos da região promotora e éxon 1, relacionados com baixa/intermediária expressão de MBL e alta frequência de crises vaso-oclusivas em crianças com anemia falciforme. Assim, conforme Bitsch *et al.* (2009), a MBL parece de fato desempenhar um papel na cura das UMIs, seja modulando a inflamação ou mesmo contribuindo para a depuração de micro-organismos e eliminação de células apoptóticas.

Possivelmente a dissonância entre nossos dados e os previamente relatados por outros autores se deva ao número reduzido de amostras que foi utilizado neste trabalho. Na verdade, esse número de indivíduos reduzido pode

ser atribuído ao baixo número de pacientes que possuíam UMIs ainda em andamento e que se dispuseram a participar desta pesquisa.

Também, estudos tem demonstrado haver uma associação entre baixos níveis de MBL ou polimorfismo do gene *MBL2* e o aumento no risco para desenvolvimento de infecções (Eddie Ip et al., 2009; Lambourne et al., 2009; Tu et al., 2015; Araújo et al., 2015).

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho mostraram não haver associação estatisticamente significativa entre os as infecções observadas nas UMIs dos sujeitos da pesquisa e o polimorfismo do gene *MBL2*.

Os haplótipos mais frequentes foram LYA/LYA (16,6%), LYA/LXA e HYA/LXA com 13,3% cada. As frequências dos haplótipos relacionados a níveis de produção de MBL considerados alto, intermediário e baixo foram 0,34; 0,43 e 0,27, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Mullighan *et al.* (2002); Bodamer *et al.*, (2007) e Holanda *et al.* (2014), que observaram alta frequência dos haplótipos LYA e HYA, e em todos estes trabalhos os níveis séricos de MBL não foram diferentes entre os grupos estudados.

De forma semelhante aos nossos resultados, foi relatada a ausência de associação com significância estatística entre baixos níveis de MBL e candidíase vulvovaginal recorrente (Henic; Thiel; Mardh, 2010), infecções causadas por *P. aeruginosa* em úlceras de perna crônicas (Jacobsen *et al.*, 2010) ou infecções em pacientes com leucemia linfocítica crônica (Holanda *et al.*, 2014).

A ausência de associação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e a presença de infecções em UMIs verificada neste trabalho pode residir em diferentes pontos de vista, considerando os diversos mecanismos de ação dos patógenos. O combate àqueles extracelulares, como os observados nesse estudo, pode ocorrer por meio de mecanismos compensatórios, como verificado por Jacobsen *et al.* (2010) cujos pacientes que apresentavam baixos níveis séricos de MBL possuíam IgG<sub>1</sub> elevados, conhecida opsonina e iniciador do sistema complemento.

No que se refere aos patógenos intracelulares, Holanda *et al.* (2014) argumenta que sofrem ação do sistema imune inato apenas quando expostos

ao ambiente extracelular, sendo a alteração nos níveis de MBL pouco importante para sua eliminação.

Ainda, é válido salientar que os portadores das lesões discutidas neste trabalho apresentavam condições de educação e sócio-econômicas que dificultavam o acesso aos meios adequados de cuidado. Pode-se citar o desconhecimento dos hábitos de higiene corretos para o manejo das UMs, carência de materiais apropriados para troca periódica de curativos, pouca disponibilidade de curativos sintéticos com agentes antimicrobianos ou de leitos hospitalares para fornecimento de assistência especializada, podendo interferir de modo substancial no curso da infecção.

## 7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados ao longo do desenvolvimento da pesquisa podemos inferir que:

- a) As UMIs em pacientes com anemia falciforme apresentam extensão tecidual variável e longo período de duração;
- b) As infecções das UMIs em pacientes com anemia falciforme geralmente são policróbicas, sendo as espécies bacterianas mais frequentes *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e, dentre os fungos, destaca-se o gênero *Candida*;
- c) A taxonomia molecular foi o melhor método de identificação das diferentes espécies do gênero *Candida* quando comparado à taxonomia clássica e VITEK;
- d) Os marcadores moleculares GACA<sub>4</sub>, GTG<sub>5</sub> e M13 são adequados para a verificação de similaridade genética entre isolados de *Candida duobushaemulonii*;
- e) Pela primeira vez foram diagnosticadas infecções fúngicas por espécies de *Candida duobushaemulonii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* em UMIs de pacientes com anemia falciforme;
- f) *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* isoladas de UMIs em pacientes com anemia falciforme se destacaram na produção de biofilmes;
- g) Cepas de *C. duobushaemulonii* isoladas de UMIs de pacientes com anemia falciforme foram sensíveis a anidulafungina e ciclopirox olamina, sendo resistentes a anfotericina B, fluconazol, voriconazol e cetoconazol.
- h) Isolados de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* obtidas de UMIs de pacientes com anemia falciforme apresentaram sensibilidade dose-dependente ao voriconazol.
- i) Os baixos níveis de Hb total e HbF estão relacionados com maior incidência de UMIs em pacientes com anemia falciforme.
- j) O haplótipo  $\beta^s$  não parece estar relacionado com o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores nos pacientes com anemia falciformes estudados;

k) Não foi possível verificar associação entre desenvolvimento e/ ou infecção em UMIs de pacientes com anemia falciforme e o polimorfismo do gene *MBL2*.

## REFERÊNCIAS

- Adekile AD. Mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis, clinical presentation and management recommendations. 2005. *Current Paediatrics*.15: 57- 61.
- Adorno, E. V., Couto, F.D., Moura Neto, J.P., Menezes, J.F., Rego, M.Reis, M.G., Gonçalves, M.S. 2005. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 21(1): 292-298.
- Adorno, E.V., Zanette, A., Lyra, I., Seixas, M.O., Reis, M.G., Gonçalves, M.S. 2008. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. *Genet. Mol. Biol* 31(3): 621-625.
- Adorno, E.V., Zanette, A., Lyra, I., Souza, C.C., Santos, L.F., Menezes, J.F., Dupuit, M.F., Almeida, M.N.T., Reis, M.G., Gonçalves, M.S. 2004. The  $\beta$  – globin gene *cluster* haplotypas in sickle cell anemia patients from northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin* 28(3): 267-71.
- Alves, A.L. 1996. Estudo da mortalidade por anemia falciforme. *Inf Epidemiol SUS* 5(4): 45-53.
- Ambrosio, A.R. 2005. Leishmania (Vianna) braziliensis: Ativação do sistema complemento e interação com a lectina ligante da manose (MBL). In Ciências Farmacêuticas. Curitiba: Universidade Federal Paraná.
- Amim, L. H., Pacheco, A.G., Fonseca-Costa, J., Loredó, C.S., Rabahi, M.F., Melo, M.H., Ribeiro, F.C., Mello, F.C., Oliveira, M.M., Lapa, E., Silva, J.R. 2007. Role of IFN- gamma +874 /A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep*. 157:423-29.
- Ampel, N.M., Dionne, S.O., Giblin, A., Podany, A.B., Galgiani, J. 2009. Mannose-binding lectin serum levels are low in persons with clinically active coccidioidomycosis. *Mycopathologia* 167: 173-180.
- Araújo, F.J., Mesquita, T.G., Silva, L.D., Almeida, S.A., Vital, W., Chrusciak-Talhari, A., Guerra, J.A., Talhari, S., Ramasawmy, R. Functional variations in MBL2 gene are associated with cutaneous leishmaniasis in the Amazonas state of Brazil. *Genes Immun*. 2015. 16(4): 284-8.
- Araújo, M.C., Serafim, E.S., De Castro JR, W.A., De Medeiros, T.M. 2004. Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 20(1): 123-128.
- Asbeck, E.C., Hoepelman, A.I.M., Scharringa, J., Herpers, B.L., Verhoef, J. 2008. Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells. *BMC Microbiology* 8: 229.
- Ashley-Koch, A., Yang, Q., Onley, R.S. 2000. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a huge review. *Am. J. Epidemiol* 151(9): 839-845.
- Aslan, M., Freeman, B.A. 2007. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*. 43 1469-83.
- Association of the MBL2 gene EXON1 polymorphism and vasoocclusive crisis in patients with sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 121: 212-215.
- Auriti, C., Prebcipe, G., Inglese, R., Azzari, C., Ronchetti, M.P., Tozzi, A., Seganti, G., Orzalesi, M., Benedetti, F.D. 2010. Role of mannose-binding lectin in nasocomial sepsis in critically ill neonates. *Human Immunology* 71: 1084-1088.
- Babula, O., Lazdane, G., Kroica, J., Ledger, W.J., Witkin, S.S. 2005. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clinical Infectious Diseases* 37: 733-737.
- Ballas, SK., Mohandas, N. 1996. Pathophysiology of vaso-occlusion. In: Charache S, Jonhson CS. (eds.). Hematology/Oncology Clinics of North America - Sickle

- Cell Disease. 10(6):1221-39.
- Bandeira, F.M.G., Leal, M.C., Souza, R.R., Furtado, V.C., Gomes, Y.M., Marques, N.M. 1999. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina "S" detectados através de triagem de sangue de cordão umbilical. *J. Pediatr.*75(3): 167-171.
- Bandeira, F.M.G.C., Santos, M.N.N., Bezerra, M.A.C., Gomes, Y.M., Araujo, A.S., Braga, M.C., Souza, W.V., Abath, F.G.C. 2008. Triagem familiar para o gene HBB\*S e detecção de novos casos de traço falciforme em Pernambuco. *Ver. Saúde Pública.* 42(2):234-41.
- Bandeira, F.M.G.C.; Bezerra, M.A.C.; Santos, M.N.N.; Gomes, Y.M.; Araújo, A.S.; Abath, F.G.C. 2007. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 29(2): 179-184.
- Bansal, E.; Garg, A.; Bhatia, A.; Attri, K.; Chander, J. 2008. Spectrum PF microbial flora in diabetic foot ulcers. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 51: 204-208.
- Bellamy, R., Ruwende, C., Mcadam, K.P., Thursz, M., Sumiya, M., Summerfield, J., Gilbert, S.C., Corrah, T., Kwiatkowski, D., Whittle, H.C., Hill, A.V. 1998. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 91: 13-18.
- Beutler, E. 1995. The sickle cell diseases and related disorders In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al. (Ed) 5a ed. McGraw-Hill.
- Bezerra, M.A.C., Santos, M.N.N., Araújo, A.S., Gomes, Y.M., Abath, F.G.C., Bandeira, M.G.C. 2007. Molecular variations linked to the grouping of  $\beta$  – and  $\alpha$  – globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin.* 31(1): 1-6.
- Bhaumik, K. 1994. Fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia: some molecular considerations. *Am J. Hematol.* 46(2): 101-106.
- Bonar, A., Chmiela, M., Rozalska, B. 2004. Level of mannose-binding lectin (MBL) in patients with tuberculosis. *Pneumonologia Polska.* 72: 201-205.
- Bouwman, L.H., Roep, B.O., Ross, A. 2006. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Human Immunology* 67: 247-256.
- Bowers AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M (2013) Blood Viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLOS ONE* 8(7):e68929.
- Bowler, P.G.; Davies, B.J. 1999. The microbiology of infected and noninfected leg ulcers. *International Journal of Dermatology* 38:573-578.
- Brandelise, S., Pinheiro, V., Gabetta, C.S., Hambleton, I., Serjeant, B., Serjeant, G. 2004. Newborn screening for sickle cell disease in Brasil: the Campinas experience. *Clin. Lab. Haematol.* 26(1):15-19
- Brouwer, N., Dolman, K.M., van Houdt, M., Sta, M., Roos, D., Kuijpers, T.W. 2008. Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *Journal of Immunology* 180: 4124-4132.
- Bunn, H. F., Forget, B.G. 1986. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Bunn, H.F. 1997. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.*337(11): 762-769.

- Cajado, C., Cerqueira, B.A., Couto, f.d., Moura-Neto, J.P., Vilas-Boas, W., Dorea, M.J *et al.* 2011. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308 G>A and -251 A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine* 56(2):312-7.
- Cançado. 2007. A doença falciforme no Brasil. *Ver. Brás. Hematol. Hemoter.* 29 (3): 203- 206.
- Cardoso, G.L. Estudo de fatores genéticos moduladores da heterogeneidade fenotípica da Anemia falciforme no estado do Pará. Dissertação de Mestrado, 2005.UFPA, 123p.
- Cardoso, G.L., Guerreiro, J.F. 2006. African gene flow to North Brazil as revealed by HBB\*S gene haplotype analysis. *Am.J.Hum.Biol.* 18: 93-98.
- Carvalho, E.C. 2006. Investigação da Lectina Ligadora de Manose (MBL) em pacientes com doença celíaca.
- Chagas, K.N., Steffensen, R., Ferrão, M.S.C., Arruk, V.G., Berg, H.A., Dellanegra, M., Juliano, Y., Duarte, A.J.S., Rutz, R., Kirschfink, M., Jensenius, J.C., Grumach, A.S. 2005. Avaliação da concentração sérica de MBL e sua atividade funcional na transmissão materno-fetal do HIV. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* 28:284-291.
- Chang, Y.P., Maier-Redelsperger, M., Smith, K.D., Contu, L., Ducroco, R., De Montalembert, M., Belloy, M., Elion, J., Dover, G.J., Girot, R. 1997. The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels; a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br. J. Haematol.* 96: 806-814.
- Chellan, G., Shivaprakash, S., Ramaiyar, S.K., Varma, A.K., Varma, N., Sukumaran, M.T., Vasukutty, J.R., Bal, A., Kumar, H. 2010. Spectrum and prevalence of fungi infecting deep tissues of lower-limb wounds in patients with type 2 diabetes. *J Clin Microbiol.* 48(6):2097-2102.
- Chiang, E.Y., Frenette, P.S. 2005. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am.* 19:771-84.
- Chies, J.A.B., Nardi, N.B. 2001. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Medical Hypotheses.* 57(1): 46-50.
- Choi, E.H., Taylor, J.G., Foster, C.B., Wash, T.J., Anttilla, V.J., Ruutu, T., Palotie, A., Chanock, S.J. 2005. Common polymorphisms in critical genes of innate immunity do not contribute to the risk for chronic disseminated candidiasis in adult leukemia patients. *Medical Mycology* 43: 349-53.
- Chong, W.P., To, Y.F., Ip, W.K., Yuen, M.F., Poon, T.P., Wong, W.H.S., Lai, C.L., Lau, Y.L. 2005. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 42: 1037-1045.
- Christiansen, O.B., Kilpatrick, D.C., Souter, V., Varming, K., Thiel, S., Jensenius, J.C. 1999. Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage. *Scandinavian J Immunology.* 49:193-196.
- Connes, P., Lamare, Y., Hardy-Dessurces, M., Lemonne, N., Waltz, X., Mouguel, D., Mukizi-Mukasa, M., Kakanne-Mistruh, M., Tarer, V., Tressieres, B., Etienne-Julan, M., Romana, M. Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. 2013. *Plosone.* 8:1-4.
- Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF (2009). Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin.*; v.33; n.1; p.1-16.
- Conran, N., Gambero, A., Ferreira, H.H., Antunes, E., De Nucci, G. 2003. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4 integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochem Pharmacol.* 66:43-50.

- Costa, F.F. 2001. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: Fundamentos e Prática. São Paulo: Ed. Atheneu. Cap 30, p.289-308.
- Costa, F.F. Anemia Falciforme. In: Zago, M.A.; Falcão, R..P.; Pasquini, R.(Ed.). Hematologia Fundamentos e Prática. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 30, p. 289-307.
- Costa, F.F., Arruda, V.R., Gonçalves, M.S., Miranda, S.R., Carvalho, M.H., Sonati, M.F., Saad, S.O., Gesteira, F., Fernandes, D., Nascimento, M.L. 1994.  $\beta^S$  - Gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. *Am. J.Hematol.* 45(1): 96-97.
- Crery, M., Williamson, D., Kulkarni, R. 2007. Sickle cell disease: Current activities, public health implications, and future directions. *J Womens Health (Larchmt)* 16 (5): 575-582.
- Crosdale, D.J, Poulton, K.V., Ollier, W.E., Thomson, W., Denning, D.W. 2001. Mannose- binding lectin gene polymorphisms as a susceptibility factor for chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *The Journal of Infectious Diseases* 184: 653-656.
- Cruz, H. L. A; Silva, R. C; Segat, L; Carvalho, M. S. Z. M. G; Brandão, L. A. C; Guimarães, R. L; Santos, F. C. F; Lira, L. A. S; Montenegro, L. M. L; Schindler, H. C; Crovella, S. MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a northeastern Brazilian population. *Infection, Genetics and Evolution* 2013. 19: 323–329
- Dacie, J.V., Lewis, S.M. Practical hematology.6. Ed. Churchill Livingstone, 1984.
- Dagher, F.J.; Algoni, S.V.; Smith, A. 1987. Bacterial studies of leg ulcers. *Angiology* 29:641- 653.
- Damiens, S; Poissy,J; François, N; Salleron, J; Jawhara, S; Jouault, T; Poulain, D; Sendid, B. Mannose-binding lectin levels and variation during invasive candidiasis. *J Clin Immunol.* 2012 32(6):1317-23.
- Davies, E.J., The, L.S., Ordi-Ros, J., Snowden, N., Hillarby, M.C., Hajeer, A *et al.* 1997. A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. *J Rheumatol* 24: 485-488.
- De Franceschi, L., Cappellini, M.D., Olivieri, O. 2011. Thrombosis and sickle cell disease. *Semin Thromb Hemost*, 37 (3): 226-36.
- Degan, S.E., Thiel, S., Jensenius, J.C. 2007. New perspectives on mannan-binding lectin- mediated complement activation. *Immunology* 212: 301-311.
- Di Nuzzo, D.V.P., Fonseca, S.F. 2004. Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria.*80: 347-54.
- Diggs, L.W.C.R. 1934. Pathology of sickle cell disease in Nigeria. *Tropical and geographical medicine* 31: 87-91.
- Dinasarapu, A.R., Chandrasekhar, A., Fujita, T., Subramaniam, Sankar. 2013. Mannose/mannan- binding lectin. *UCSD Molecule Pages* 2(1): 8- 18.
- Dommet, R.M., Klein, N., Turner, M.W. 2006. Mannose-binding lectin in innate immunity: Past, present and future. *Tissue Antigens* 68: 193-209.
- Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Smith, E., Rhoads, D. Polymicrobial Nature of Chronic Diabetic Foot Ulcer Biofilm Infections Determined Using Bacterial Tag Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing (bTEFAP). 2008. *Plosone.* 3:1-7.
- Driss. A.; Asare, K.O.; Hibbert, J.M.; Gee, B.E.; Adamkiewicz, T.V; Stilles, J.K. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics Insights.* 30(2): 23–48, 2009.
- Ducatti, R.P., Teixeira, A.E.A., Galão, H.A., Bonini-Domingos, C.R., Fett-Conte, A.C. 2001. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém- nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. *Ver. Bras.*

*Hematol. Hemoter.* 23(1):23-29.

- Eisen, D.P., Dean, M.M., O' Sullivan, M.V., Heatley, S., Minchinton, R.M. 2008. Mannose-binding lectin deficiency does not appear to predispose to cryptococcosis in non- immunocompromised patients. *Medical Mycology* 46: 371-375.
- Eisen, D.P., Minchinton, R.M. 2003. Impact of Mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clinical Infections Diseases* 37: 1496-1505.
- Embury, SH. 1995. Sick cell disease. In: Hoffman MD; Benz Jr EJ; Shattil SJ; Furie B; Cohen, HJ; Silberstein, LE. Hematology: Basic Principles and Practice. 43: 611-648.
- Fairbanks, V.F., Klee, G.C. 1987. Biochemical aspects of Hematology. 1987. In: Tietz, N.W. Fundamentals of clinical chemistry. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2(24): 789-824.
- Farah, S.B. DNA no diagnóstico das doenças humanas. In: FARAH, S.B.(Ed.). DNA Segredos e Mistérios. São Paulo: Sarvier, 2000. cap. 5, p. 126.
- Fathallah, H.; Atweh, G. F. 2006. Induction of Fetal Hemoglobin in the Treatment of Sick Cell Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*.7: 58-62.
- Fernandes, L.F.; Pimenta, F.C.; Fernandes, F.F. Isolamento e perfil de suscetibilidade de bactérias de pé diabético e úlcera de estase venosa de pacientes admitidos no pronto- socorro do principal hospital universitário do estado de Goiás, Brasil. *J. Vasc. BraS.* 6: 211 -217, 2007.
- Figueiredo, M.S. 2007. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 29(3): 215-217.
- Fleury, M.K. 2006. Haplótipos do *cluster* da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: aspectos clínicos e laboratoriais. *Ver. Bras. Anál. Clín.* 39(2): 89-93.
- Franceschi, L., Corrocher, R. 2004. Establish and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica.* 89(3): 348-356.
- Frank, D.N.; Wysoki, A.; Specht-Glick, D.D.; Rooney, A.; Feldman, R.A.; Amand, A.L.; Pace, N.R.; Trent, J.D. 2009. Microbial diversity in chronic open wounds. *Wound Repair Regen.* 17:163 – 172.
- Frenette, P.S., Atweh, G.F. 2007. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The journal of Clinical Investigation.* 17(4): 850-858.
- Frenette, P.S., Atweh, G.F. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. 2007, 7:850-859.
- Fuchs, F.D., Wannamacher, L. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional, 4e° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p1282.
- Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin – complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev. Immunol.* 2: 346-353.
- Gácsér, A., Schafer, W., Nosanchuk, J.S., Salomon, S., Nosanchuk, J.D. 2007. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol.* 44(12):1336-41.
- Galiza Neto, G. C., Pitombeira, M.S., Vieira, H.F., Vieira, M.L.C., Frias, D.A.B. 2005. Análise dos haplótipos do gene da  $\beta^S$  – globina no Ceará. *J Bras Patol Med Lab.* 41(5): 315-321.
- Galiza Neto, G.C., Pitombeira, M.S. 2003. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 39(1): 51-56.
- Garcia-Laorden, M.I., Sole-Violan, J., Castro, F.R., Aspa, J., Briones, M.L., Garcia-Saavedra, A., Rajas, O., Blanquer, J., Caballero-Hidalgo, A., Marcos-Ramos, A., Hernandez-Lopes, J., Rodrigues-Gallego, C. 2008. Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility,

- severity, and outcome of pneumonia in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122:368- 374.
- Gardner, S.E.; Frantz, R.A.; Doebbeling, B.N. 2001. The validity of the clinical symptoms used to identify localized chronic wound infection. *Wound Repair Regen* 29:178-186.
- Garred, P., Harboe M., Oettinger, T., Koch, C., Svejgaard, A. 1994. Dual role of mannan- binding protein in infections: another case of heterosis? *European Journal of Immunogenetics* 21: 125-131.
- Garred, P., Madsen, H.O., Kurtzhals, J.A., Lamm, L.U., Thiel, S., Hey, A.S., Svejgaard, A. 1992a. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in black Africans. *European Journal of Immunogenetics* 19: 403-412.
- Garred, P., Richter, C., Andersen, A.B., Madsen, H.O., Mtoni, I., Svejgaard, A., Shao, J. 1997b. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scandinavian Journal Immunology* 46: 204-208,
- Garred, P., Thiel, S., Madsen, H.O., Ryder, L.P., Jensenius, J.C., Svejgaard, A. 2006. Gene frequency and partial protein characterization of an allelic variant of mannan binding protein associated with low serum concentrations. *Clin Exp Immunol.* 90: 517-521.
- Giraldó, P.C., Babula, O., Gonçalves, A.K.S., Linhares, I.M., Amaral, R.L., Ledger, W.J., Witkin, S.S. 2007. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology* 109: 1123-1128.
- Gonçalves, E.G.R.; Reis-Filho, S.A.; Oliveira, E.G.O.; Pareira, A.L.N.; Silva, A.R.; Costa, J.M.L. 2009 Infecção bacteriana na leishmaniose cutânea: padrão bacteriano e sensibilidade a antibióticos. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* 42: 219-221.
- Gonçalves, M.S., Bomfim, G.C., Maciel, E., Cerqueira, I., Lyra, I., Zanette, A., Fernandes, G.B., Reis, M.G. 2003.  $\beta^s$  – Hplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36(10): 1283-1288.
- Gonçalves, M.S., Nechtman, J.F., Figueiredo, M.S., Kerbauy, J., Arruda, V.R., Sonati, M.F., Saad, S.O.T., Costa, F.F., Stoming, T.A. 1994. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: a study of the beta s haplotypes. *Hum Hered.* 44(6): 322:327.
- Gordon, A.C., Waheed, U., Hansen, T.K *et al.* Mannose-binding lectin polymorphism in severe sepsis: relationship to levels, incidence, and outcome, *Shock* 25. 2006:88-93.
- Guardia, A., Lozano, F. 2003. Mannose-binding lectin deficiencies in infections and inflammatory disorders. *Reviews in Medical Microbiology* 14:41-52.
- Gulla, K.C., Gupta, K., Krarup, A., Gal, P., Schwaeble, W.J., Sim, R.B., O' Connor, C.D., Hajela, K. 2009. Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology* 129: 482-495.
- Gumiero, A.P.S., Brandão, M.A.B., Pinto, E.A.L.C., Anjos, A.C. 2007. Colelitíase no paciente pediátrico portador de doença falciforme. *Rev Paul Pediatr.* 25(4):377-81.
- Halabi-Tawil, M., Lionnet, F., Girot, R., Bachmeyer, C., Levy, P.P., Aractingi, S. Sickle cell leg ulcers: a frequently disabling complication and a marker of severity. 2008. *British Journal of Dermatology.* 158:339-344.
- Heitzeneder, S., Seidel, M., Förster-Waldl, E., Heitger, A. 2012. Mannan-binding lectin deficiency –Good news, bad news, doesn't matter? *Clinical Immunology.* 143, 22-38.
- Helda, K., Thielb, S., Loossa, M., Petrya, F. 2008. Increased susceptibility of complement factor B/C2 double Knockout mice and mannan-binding lectin

- Knockout mice to systemic infection with *Candida albicans*. *Molecular Immunology* 45: 3934-3941.
- Henic, E., Thiel, S., Mardh, P.A. 2010. Mannan-binding lectin in women with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 148: 263-165.
- Herrick, J.B. 1910. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch. Int. Med.* 6: 517-521.
- Herrick, J.B. 1924. Abstract of discussion. *JAMA.* 83:16.
- Herrick, J.B. Peculiar enlogated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *The Yale journal of biology and medicine* 74:179-184, 2001.
- Higgs, D.R., Wood, W.G. 2008. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(33):11595-6.
- Hladnik, U., Braida, L., Boniotto, M., Pirulli, D., Gerin, F., Amoroso, A., Crovella, S. 2002. Single-tube genotype of MB-2 polymorfisms using melting temperature analysis. *Clin Exp Med.* 2: 105-108.
- Hoal-Van Helden, E.G., Epstein, J., Victor, T.C., Hon, D., Lewis, L.A., Beyers, N., Zurakowski, D., Ezekowitz, A.B., Van Helden, P.D. 1999. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediatrics Research*, 45: 459- 464.
- Holanda, K., Lucena-Araujo, A.R., Quintas, A., Mendonça, T., Lima, A., Vasconcelos, L.r., Moura, P., Cavalcanti, M., Machado, C., Araújo, A.S., Bezerra, M .A. Mannose-bibding lectin 2 (MBL2) gene frequency polymorphisms do not influence frequency of infections in chronic lymphocytic leukemia patients. *Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia.* 2014. 36(1): 29-34.
- Holmskov, U., Thiel, S., Jensenius, J,C. 2003. Collections and ficolins: humoral lectins of innate immune defense. *Annu Rev Immunol* 21: 547-578.
- Howell-Jones, R.S.; Wilson, M.J.; Hilli, K.E.; Howard, A.J.; Price, P.E.; Thomas, D.W. 2005. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J. Antimicrib Chemother*, 55: 143-149
- Inatti, A., Aher, A., Bou Alawi, W., Koussa, S., Kaspar, H., Shbaklo, H., Zaulloa, P.A. 2003. Beta-globin gene *cluster* haplotypes and HbF levels are not the only modulators of the sickle cell disease in Labanon. *Eur. J. Haematol.* 70: 79-83.
- Iníguez, E.D., López, M.A.C., Julian, M.E.C., García, P.G. 2003. Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías em La comunidad autónoma de Madrid. Estudio piloto. *Na Pediatr.* 58: 146-55.
- Ip, W.K.E., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A., Stuart, L.M. 2009. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunological Reviews* 230: 9-21.
- Jack, D.L., Klein, N.J., Turner, M.W. 2001. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol Rev.* 180: 86- 99.
- Júnior, J., A. C. Rodrigues, *et al.* 2007. Coronary Flow Reserve in Sickel Cell Anemia. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia.* 88(5):488-493.
- Kato, G. J., Gladwin, M. T., Steinberg, M. H. 2007. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews* 21: 37-47.
- Kaul, D.K., Liu, X.D., Chang, H.Y., Nagel, R.L., Fabry, M.E. 2004. Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J Clin Invest.* 114:1136-45.
- Kaur, S., Gupta, V.K., Thiel, S., Samara, P.U., Madan, T. 2007. Protective role of mannose-binding lectin in a murine modelo f invasive pulmonary apergilosis. *Clinical and Experimental Immunology* 148: 382-389.
- Kawasaki, T., Etoh, R., Yamashina, I. 1978. Isolation and characterization of a mannan- binding protein from rabbit liver. *Biochemical Biophysical Research*

- Communications* 81: 1018-1024.
- Kelly, P., Jak, D.L., Naem, A., Mandanada, B., Pollok, R.C., Klein, N.J., Turner, M.W., Farthing, M.J. 2000. Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology*. 119:1236-1242.
- Kilpatrick, D.C. 1998. Phospholipid-binding activity of human mannan-binding lectin. *Immunology Letters* 61:191-195.
- Klabunde, J., Berger, J., Jensenius, J.C., Klinkert, M.Q., Zelck, U.E., Kremnsner, P.G., Kun, J.F. 2000. *Schistosoma mansoni*: adhesion of mannanbinding lectin to surface glycoproteins of cercariae and adult worms. *Experimental Parasitology*, 95: 231-239.
- Klabunde, J., Uhlmann, A.C., Tebo, A.E., Kimmel, J., Schwarz, P.G., Kremnsner, P.G., Kun, J.F. 2002. Recognition of *Plasmodium falciparum* proteins by mannan-binding lectin, a component of the human innate immune system. *Parasitology Research*, 88: 113-117.
- Klotman, M.E., Chang, T.T.L. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Immunology* 6: 447-456.
- Koch, A., Melbye, P., Sorensen, P *et al.* Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 285. 2001. 1316-1321.
- Koshy, M.; Entsuah, R.; Koranda. 1989. A. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood* 74: 1403-1408.
- Kutlar A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. *Hemoglobin*. 2007;31(2):209-24.
- kutlar, A. 2007. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. *Hemoglobin*. 31(8): 209-224.
- Ladizinski, B.; Bazkas, A.; Mistry, N.; Alavi, A.; Sibbald, R.G.; Salcido, R. 2012. Sickle cell disease and leg ulcers. *Advances in skin & wound care*, v.25, pp. 421-428.
- Lee, S.J., Gonzales-Asequinolaza, G., Nussenzweig, M.C. 2002. Disseminated candidiasis and hepatic malarial infection in mannose-binding-lectin-a-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* 22: 8199-8203.
- Lobo, C.L.C., Bueno, L.M., MOURA, P., Ogeda, L.L., Castilho, S., Carvalho, S.M.F. 2003. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil. *Panam. Salud. Pública* 13(2): 154-159.
- Lyon, G.M., Karatela, S., Sunay, S., Adiri, Y. Candida surveillance study investigators: Antifungal susceptibility testing of Candida isolates from the Candida surveillance study. 2010. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:1270-1275.
- Macedo, J.L.S.; Rosa, S.C.; Castro, C. Spsis in burned patients. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* 36:647-652, 2003.
- Macka, A. K., Katoa G.J. 2006. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int.J. Biochem. Cell Biol.* 38(8):1297-1243.
- Madigan, C., Malik, P. 2006. Pathophysiology and therapy or haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Rev Mol Med.* 8:1-26.
- Madsen, H.O., Garred, P., Kurtzhals, J.A., Lamm, L.U., Ryder, L.P., Thiel, S., Svejgaard, A. 1994. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*. 40:37-44.
- Magaña, M.T., Ongaz, Z., Tagle, J. *et al.* 2002. Analysis of  $\beta^S$  and  $\beta^A$  Genes in a Mexican population with African roots. *Blood Cells Mol Dis.* 28(2):121-126.
- Malhotra, R., Wills, A.C., Lopes Bernal, A., Thiel, S., Sim, R.B. 1994. Mannan-binding protein levels in human amniotic fluid during gestation and its interaction with collection receptor from amnion cells. *Immunology* 82: 439-444.
- Marengo-Rowe, A.J. 2006. Structure-function relations of human hemoglobins. *Baylor University Medical Center Proceedings* 19 (3): 239-245.

- Martins, P.R., Moraes-Souza, H., Silveira, T.B. 2010. Mortalidade em doença falciforme. *Bras Hematol Hemoter.* 32(5):378-83.
- Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I., Fujita, T. 2000. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *The Journal of Immunology* 165: 2637-2642.
- McMahon, Tamary, H; Askin, M; Adams-Graves, P; Eberhardt, R, T; Sutton, M; Castaneda, S.A; Faller, D.V; Perrine, S.P. A randomized phase II trial of Arginine Butyrate with standard local therapy in refractory sickle cell leg ulcers. 2010 British Journal of Haematology, 151, 516–524.
- Mendonça, T.F., Oliveira, M.C.V.C., Vasconcelos, L.R.S., Perreira, L.M.M.B., Moura, P., Bezerra, M.A.C., Santos, M.N.N., Araújo, A.S., Cavalcanti, M.S.M. 2010. Association of variant alleles of MBL2 gene with vasoocclusive crisis in children with sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 44: 224-228.
- Meneses, J.V.L.; Ribeiro, I.L.F.; Guedes, A.; Fortuna, V.A.; Sobrinho, P.C.; Sadigurski, D.; Daltro, G. 2010. Maleolar ulcers um sickle cell disease patients: clinical and operatory menagment. *Gazeta Médica da Bahia* 80: 89 – 94.
- Mertz, P.M.; Eaglstein, W.H. 1984. The effect of a semiocclusive dressing on the microbial population in superficial wounds. *Arch. Surg.* 119: 287 – 289.
- Metcalfe, S.A., Barlow-Stewart, K., Campbell, J., Emery, J. 2007. Genetics and blood Haemoglobinopathies and clotting disorders. *Aust. Fam. Physician.* 36(10): 812-819.
- Milanese, M., Segat, L., De Seta, F., Piruli, D., Fabris, A., Morgutti, M., Crovella, S. 2008. MBL2 genetic screening in patients with recurrent vaginal infections. *American Journal of Reproductive Immunology* 59: 146-151.
- Minaric-Missoni, E.; Kalenic, S.; Vukelic, M.; Syo, D.; Belicza, M.; Vazic-Babic. 2005. Candida infections of diabetic foot ulcers. *Diabetologia Croatica* 34: 29 – 35.
- Moller-Kristensen, M., Hamblin, M.R., Thiel, S., Jensenius, J.C., Takahashi, K. Burn injury reveals altered phenotype in mannan-binding lectin-deficient mice. *J Invest Dermatol.* 2007. 127: 1524-31.
- Monticelo, O.A. 2008. Estudos dos polimorfismos da Lectina Ligadora de Manose em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.
- Morelli, V.M. 2004. Estrutura de funções das plaquetas e das células endoteliais. Hematologia: fundamento e prática, Ed. Atheneu, p. 239.
- Moreno, N., Martinez, J.A., Blanco, Z, et al. 2002. Beta- globin cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the state of Aragua. *Genet Mol Biol.* 25(1): 21-24.
- Mousinho-Ribeiro, R.C., Cardoso, G.L., Sousa, I.E.L., Martins, P.K.C. Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. 2008. Revista da Sociedade Brasileira de Hematologia 30(2): 136-141.
- Muszlak, M., Pissard, S., Badens, C., Chamouine, A., Maillard, O., Thuret, I. Genetic Modifiers of Sickle Cell Disease: A Genotype-Phenotype Relationship Study in a Cohort of 82 Children on Mayotte Island. 2015. *Hemoglobin.* Mar 25:1-6.
- Nagel, R.D; Platt, O.S. General Pathophysiology of Sickle Cell Anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin – Genetics, Pathophysiology and Clinical Management. Cambridge University Press: Ed. USA, cap. 20; p.494-526, 2001.
- Nagel, R.L. 1984. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quart. J. Biol. Med.* 2: 53-62.
- Naoum, P.C. Hemoglobinopatias e talassemias. Sarvier, 1997.
- Naoum, P.C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. 2000. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 22: 05-22.

- Nedovic, B; Posteraro, B; Leoncini, E; Rugerri, A; Amore, R; Sanguinetti, M; Ricciardi, W; Boccia, S. Mannose- Binding Lectin Codon 54 Gene Polimorphism and Vulvovaginal Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2014. *BioMed Research International*. 1-8.
- Neth, O., Jack, D.L., Johnson, M., Klein, N.J., Turner, M.W. 2002. Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology* 169: 4430-4436.
- Neth, O., Jack, D.L., Dodds, A.W., Holzel, H., Klein, N.J., Turner, M.W. 2000. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infection and Immunity* 68: 688-693.
- Niewerth, M; *et al.* Ciclopirox Olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors. 2003. *Antimicrob Agents Chemother*, v.47, p 1805-1817.
- Nolan, V.G., Wyszynski, D.F., Farrer, L.A., Steinberg, M.H. 2005. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*. 106(9): 3264-7.
- Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwes, B., Fadok, V.A *et al.* 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exper Med* 194: 781-795.
- Okumura, J.V., Lobo, C.L.C., Bonini-Domingos, C.R. 2013. Beta -S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 35(1): 71-2.
- Oliveira, M.C.V.C. Polimorfismo do gene *MBL2* e sua relação com eventos clínicos na anemia falciforme. 2007. Dissertação de Mestrado. UPE, 80p.
- Orsi, C.F., Colombari, B., Blasi, E. 2010. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the of the C parapsilosis complex. *Med Mycol*. 48(8): 1024-33.
- Osório-Borges, M.R., Robinson, W. *Genética Humana*, 1993, Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, Artes Médicas: 209-215.
- Paiva e Silva, R.B., Ramalho, A.S., Cassorla, R.M.S. 1993. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 27: 54-58.
- Paladino, S.F. 2007. Leg ulcers in sickle cell disease. *Rev. Bras. de Hematol. e Hemoter*. 29: 288 – 290.
- Paladino, S.F. 2007. Úlcera de membros inferiores na anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 29(3): 288-290.
- Palaniyar, N., Nadesalingam, J., Clark, H., Shih, M.J., Dodds, A.W., Reid, K.B. 2004. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *Journal of Biological Chemistry* 279: 32728-32736.
- Pedroso, M.L.A., Boldt, A.B.W., Pereira-Ferrari, L., Steffensen, R., Strauss, E., Jensenius, J.C., Ioshii, S.O., Messias-Reason, I. 2008. Mannan-binding lectin *MBL2* gene polymorphism in chronic hepatitis C: Association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 152: 258-264.
- Perrine, S.P., Castaneda, S.A., Chui, D.H.K., Faller, D.V., Berenson, R.J., Siritanaratkul, N. & Fucharoen, S. (2010) Fetal globin gene inducers: novel agents and new potential. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1202, 158–164
- Pinheiro, L.S., Gonçalves, R.P., Tomé, C.A.S., Alcântara, A.E.E., Marques, A.R.C., Silva, M.M. 2006. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. *Bras. Ginecol. Obstet*. 28(2): 122-125.
- Pitombeira, M.S., Neto, G.C.G. 2002. Aspectos moleculares na anemia falciforme.

*J Bras Patol Med Lab.* 39(1) 51-56.

- Platt, O.S. 2008. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 358(13): 1362-1369.
- Platt, O.S., Brambilla, D.J., Rosse, W.F., Milner, P.F., Castro, O., Steinberg, M.H. 1994. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 330(23): 1639-44.
- Ponte-de-Sousa, G., Ribeiro, R.C.M., Santos, E.J.M., Zago, M.A., Guerreiro, J.F. 1998. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. *Genet. Mol. Biol.* 21(4): 427-430.
- Powars, D.R. 1991.  $\beta^S$  gene cluster haplotypes in sickle cell anemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 5(3):475-493.
- Powars, D.R., Chan, L.S., Schoeder, W.A. 1990. The variable expression of sickle cell disease in genetically determined. *Hematol.* 27:360-376.
- Robinson, D., Phillips, N.C., Winchester, B. 1975. Affinity chromatography of human liver alpha-D-mannosidase. *FEBS Letters* 53: 110-112.
- Rocha, H.H.G. 2004. Úlceras de perna na anemia falciforme. Rio de Janeiro, Ed. Rubio, pp. 245 – 250.
- Rosa, A. C.; Scroferneker, M. L.; Vettorato, R.; Gervini, R. L.; Vettorato, G.; Weber, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. 2005. *J. Am. Acad. Dermatol*, v. 52, n. 3, p. 451-459.
- Rosse, W.F., Narla, M., Petz, L.D., et al. 2000. New views of sickle cell disease pathophysiology and treatment. *Hematology*, 2-17.
- Roy, S., Knox, K., Segal, S., Griffiths, D., Moore, C.E., Welsh, K.I., Smarason, A., Day, N.P., McPheat, W.L., Crook, D.W, et al. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet.* 2002. 359: 1569:1573.
- Rugonfalvi-kiss, S., Endresz, V., Madsen, H.O., Burian, K., Duba, J. 2002. Association of Chlamydia pneumonia with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. 2002. *Circulation.* 106:1071-1076.
- Rusanova, I., Cossio, G., Moreno, B., Javier Perea, F, De Borace, R.G., Perea, M et al. 2011. B-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. *Am J Hum Biol*, 23(3):377-80.
- Ruzicka, F., Holá, V., Votava, M., Tejkalová, R. 2007. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol (Praha).* 52(3):209-14.
- Saaq, M., Ahmad, S., Zaib, M.S. Burn Wound Infections and Antibiotic Susceptibility Patterns at Pakistan Institute of Medical Sciences, Islamabad, Pakistan. 2015. *World journal of plastic surgery.* 4:9-15.
- Santos, E.R., Dal Forno, C.F., Hernandez, M.G., KUBIÇA, T.F., Venturini, T.P., Chassot, F., Santurio, J.M., Alvez, S.H. Susceptibility of *Candida* spp. Isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. 2014. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo. 56(6):477-482.
- Santos, I.K., Costa, C.H., Krieger, H., Feitosa, M.F., Zurakowshi, D., Fardin, B et al., Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. 2001. *Infect Immun.* 69:5212-5215.
- Santos, JL; CHIN, CM. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. *Quím. Nova*, São Paulo. 2012; v. 35, n. 4
- Sastry, K., Herman, G.A., Day, L., Deignan, E., Bruns, G., Morton, C.C., Ezekowitz, R.A. 1989. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med* 170: 1175-1189.
- Schmiegelow, K., Garred, P., Lausen, B., Andreassen, B., Petersen, B.L., Madsen, H.O 2002. Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among

- children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 100: 3757-3760.
- Segat, L., Crovella, S., Comar, M., Milanese, M., Zanotta, N., Fabris, A., Trevisiol, C., Rossi, T., De Seta, F., Campello, C. MBL2 gene polymorphisms are correlated with high-risk human papillomavirus infection but not with human papillomavirus-related cervical cancer. 2009. *Hum Immunol*. 70:436-439.
- Serjeant GR., Serjeant BE., Mohan JS., Clare A. 2005. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin N Am* 19: 943-956.
- Seyfarth, J., Garred, P., Madsen, H.O. 2006. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin (MBL2) and the MBL associated serine protease 1-3 genes. *Molecular Immunology* 43: 962-971.
- Silva, B.L., Gonçalves, R.P. 2009. Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene  $\beta^S$  globina em Fortaleza, Ceará. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 32(1): 40-44.
- Silva, D.G., Marques, I.R. 2007. Intervenção de enfermagem durante crises algicas em portadores de Anemia Falciforme. *Revista Brasileira de Enfermagem* 60(3):327-30.
- Silva, G.K., Chies, J.A.B. 2010. O papel dos polimorfismos do gene da proteína de ligação à manose em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana.
- Silva, G.K., Guimarães, R., Mattevi, V.S., Lazzaretti, R.K., Sprinz, E., Kuhmmr, R., Brandão, L., Crovella, S., Chies, J.A.B. 2011. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in susceptibility to HIV-1 infection in Southern Brazilian patients. *AIDS*. 20;25(4):411-8.
- Silva, L.B. da., Gonçalves, R.P., Rabenhorst, S.H.B. 2009. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 45(2): 115-118.
- Silva, M.C.; Shimauti, E.L.T. 2006. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Bras. Hematol. Hemoter.* 28(2): 144-148.
- Silva, W.S., Lastra, A., Oliveira, S.F., Klutau-Guimarães, M., Grisolia, C.K. 2006. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 22(2): 2561-2566.
- Simitsopoulou, M., Kyrpitzis, D., Velegraki, A., Walsh, T.J., Roilides, E. Caspofungin at Catheter Lock Concentrations Eradicates Mature Biofilms of *Candida lusitanae* and *Candida guilliermondii*. 2014. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58 (8):4953– 4956.
- Solovey, A., Kollander, R., Shet, A., Milbauer, L.C., Choong, S., Panoskaltis-Mortari, A. 2004. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood*. 104:840-6.
- Sommer, C.K., Goldbeck, A.S., Wagner, S.C., Castro, S.M. 2006. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 22(8): 1709-1714.
- Sonati, M.F.; Costa, F.F. 2008. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J. Pediatr.* 84(4): 40-51.
- Steffensen, R., Thiel, S., Varming, K., Jersild, C., Jensenius, J.C. 2000. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Journal Clinical of Immunological Methods* 241: 33-42.
- Steinberg M.H., Rodgers, G.P. 2001. Pathophysiology of sickle cell disease: role of cellular and genetic modifiers. *Seminars in Hematology*. 38(4): 299-306.
- Steinberg, M. H. 2008. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview

- of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. The Scientific World Journal Special tissue: *Hemoglobinopathies. Review.* 8: 1295-1324.
- Steinberg, M.H. 2001a. Modulation of fetal in sickle cell anemia. *Hemoglobin.* 25: 195- 211.
- Steinberg, M.H. 2005. Predicting clinical severity in sickle cell disease. *British J Haematol.* 129: 465-81.
- Steinberg, M.H., Adewoye, A.H. 2006. Modifiers genes and sickle cell anemia. *Curr. Opin.Hematol.* 13: 131-136.
- Steinberg, M.H., Nagel, R.L. Genetic Modulation of Sickle Cell Disease and Thalassemia. In: Steinberg, M.H., Forget, B.C., Higgs, D.R., Weatherall, D.J. Disorders of Hemoglobin. 1<sup>o</sup> ed. Cambridge University Press: Ed. USA, 2009; 638-657p.
- Stuart, M.J; Nagel, R.L. Sickle cell disease. *Lancet*, 2004, 364:1343-60.
- Takahashi, E.K. Haplótipos do alelo  $\beta$ s em pacientes portadores de traço falciforme. 2005.UFPA, 146p.
- Takahashi, K., Ip, W.E., Michelow, I.C., Ezekowitz, R.A. 2006. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule, *Curr. Opin. Immunol.* 18:16–23.
- Tan, Y., Liu, L., Luo, P., Wang, A., Jia, T., Shen, X., Wang, M., Zhang, S. 2009. Association between mannose-binding lectin and HIV infection and progress in a Chinese population. *Molecular Immunology* 47: 632-639
- Taylor, M.E., Brickell, P.M., Craig, P.K., Summerfield, J.A. 1989. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J.* 262: 763-771.
- Thiel, S., Holmskov, U., Hviid, L., Laursen, S.B., Jensenius, J.C 1992. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during acute phase response. *Clin Exp Immunol.* 90:31-35.
- Trent, J.E.; Kirsner, R.S. 2004. Leg ulcer in sickle cell disease. *Advances in skin & wound care.*17:408 – 410.
- Tu, X., Chong, W.P., Zhai, Y., Zhang, H., Zhang, F., Wang, S., Liu, W., Wei, M., Siu, N.h., Yang, H., Yang, W., Cao, W., Lau, Y.I., He, F., Zhou, G. Functional polymorphisms of the CCL2 and MBL genes cumulatively increase susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Infect.* 2015.71(1):101-9.
- Tulamo, R., Frösen, J., Junnikkala, S., Paetau, A., Kangasniemi, M., Peláez, J., Hernesniemi, J., Niemelä, M., Meri, S. 2010. Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. *Laboratory Investigation* 90: 168- 179.
- Turner, M.W., Hamvas, R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. 2000. *Reviews Immunogenetics* 2: 305-322.
- Turner, M.W. 1996. Mannose binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* 17: 532-540.
- Turner, M.W. 2004. The role of mannose-binding lectin en health and disease. *Mol. Immunol.* 40: 423-429.
- Turner, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease, *Immunology.* 1998: 327-339.
- Turner, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. 1998. *Immunobiology*, 199: 327-339.
- Turner, M.W., Dinan, L., Heatlley, S., *et al.* Restricted polymorphism of the mannose-binding lectin gene of indigenous Australians, *Hum. Mol. Genet* 9 2000: 1481-1486.
- van Till, J.W., Modderman, P.W., de Boer, M., Hart, M.H., Beld, M.G., Boermeester, M.A. 2008. Mannose-binding lectin deficiency facilitates

- abdominal *Candida* infectious in patients with secondary peritonitis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 65-70.
- Vichinsky, E. 2002. New therapies in sickle cell disease. *Lancet* 360:629-31.
- Vincentin, A.L.; Gatti, M.A.N.; Weckwerth, P.H.; Carvalho, R.C.O. Etiologia da microbiota presente em úlceras venosas de usuários de Bota de Unna. *Sallusvita Bauru* 28: 65-72, 2009.
- Vinson, A.E.; Walker, A.; Elam, D.; Glendenning, M.; Kutlar, F.; Clair, B.; Harbin, J.; Kutlar, A. 2004. A novel approach to rapid determination of betaS-globin haplotypes: sequencing of the Agamma-IVS-II region. *Hemoglobin*. 28(4):317-323.
- Wallis, R. 2003. Structural Basis for Mannose-Binding Protein Function in Innate Immunity. *Immunobiology of Carbohydrates*. 1-12.
- Walsh, T.J.; et al. Correlation between *in vitro* and *in vivo* antifungal activities in experimental fluconazole-resistant oropharyngeal and esophageal candidiasis. 2000. *J Clin Microbiol*, v.38, p 2369-2373.
- Weir, S.J.; Patton, L.; Castle, K.; Rajewski, L. Kasper, J.; Schimmer, A.D. The repositioning of the antifungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. 2011. *J Clin Pharm Ther*, v.36, p 128-134.
- WHO (World Health Organization). Sickle cell anaemia. Report by the secretariat, Executive Board 117 th session. December, 2005. 5p.
- WHO, Working Group. Hereditary anemias: genetics basis, clinical features, diagnosis and treatment. *Bull. WHO*, 60: 643-60. 1982
- Wild, J., Robinson, D., Winchester, B. 1983. Isolation of mannose binding proteins from human and rabbit liver. *Biochemical Journal* 210: 167-174.
- Wood, K.C., HSU, L.L., Gladwin, M.T. 2008. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*. 44: 1506-1528.
- Worthley, D.L., Bardy, P.G., Mullighan, C.G. 2005. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal* 35: 548-555.
- Zago, M.A., Figueiredo, M.S., Ogo, S.H. 1992. Bantu  $\beta^S$  cluster predominates among Brazilian blacks. *Am J Phy Antropol*. 88: 295-98.
- Zago, M.A., Pinto, A.C.S. 2007. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Bras. Hematol. Hemoter*. 29(3): 207-214.
- Zago, M.A., Silva Júnior, W.A., Dalle, B., Gualandro, S., Hutz, M.H., Lapoumeroulie, C., Tavella, M.H., Araújo, A.G., Krieger, J.E., Elion, J., Krishnamoorthy, R. 2000. Atypical  $\beta^S$  haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am. J. Hematol*. 63:79-84.
- Zago, M.A., Silva, W.A., Franco, R.F. 1999. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. *Cienc. Cult. (São Paulo)*, v.51, n. ¾, p. 226-234.
- Zago, M.A., Silva, W.A., Gualandro, S., Yokomizu, I.K., Araujo, A.G., Tavela, M.H., Gerard, N., Krishnamoorthy, R., Ellion, J. 2001. Rearrangements of the beta-globin gene cluster in apparently typical beta S haplotypes. *Haematologica*. 86(2): 142-145.
- Zen, Q., Batchvarova, M., Twyman, C.A., Eyler, C.E., Qiu, H., De Castro, L.M., Telen, M.J. 2004. B-CAM/LU expression and the role of B-CAM/LU activation in binding of low-and high-density red cells to liminin in sickle cell disease. *Am J Hematol*. 75:63-7.
- Zhou, Z., Behymer, M., Guchhait, P. 2011. Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. *Anemia* 2011:1-5.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(resolução 196/96; 340/04; 347/05)

**Pesquisa:** Análise Microbiológica de Úlceras Maleolares em Pacientes Falciformes e Correlação com o Polimorfismo do Gene *MBL2*.

**Pesquisadores:** Caroline Sanuzi Quirino de Medeiros (Mestre), Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer (Mestre), Dr<sup>a</sup>. Luciana Rezende Bandeira de Mello, Prof. Dr. Jacinto Costa Neto, Dr. Aderson da Silva Araújo (PhD), Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves.

**Local:** Fundação Hemope / UFPE.

A finalidade deste é trazer informações para o paciente sobre o estudo “Análise Microbiológica de Úlceras Maleolares em Pacientes Falciformes e Correlação com o Polimorfismo do Gene *MBL2*”. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo.

Nós verificamos que a anemia falciforme causa morbidade provocando dores, o que pode estar interferindo com suas atividades do dia a dia e gostaríamos que você permitisse a coleta de material biológico do leito da úlcera através de swab estéril e doasse 2 tubos de sangue, obtido por punção venosa usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta do material o paciente venha a sentir dor local já para a coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, não havendo qualquer outro risco em participar da pesquisa. O material desse estudo será armazenado no HEMOPE e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e CONEP.

O paciente tem direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Como condição de participação nesta pesquisa, o paciente permite acesso aos dados obtidos durante o estudo, aos pesquisadores envolvidos neste estudo e aos membros da Comissão de Ética responsáveis pela análise do projeto. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações. A participação neste estudo é voluntária e o paciente pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem prejuízos ao seu tratamento. O pesquisador tem o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento que julgar necessário. Além disso, o paciente tem direito a qualquer esclarecimento sobre o estudo mesmo durante o seu decorrer.

Consulta de questões éticas:  
Comitê de Ética da Fundação HEMOPE  
Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171 –  
Fundação HEMOPE  
Telefone: (81) 3416-4660

Pesquisador: Msc. Caroline Sanuzi Quirino de Medeiros  
Endereço: Avenida Prof. Moraes Rego 1235 Cidade Universitária  
Recife-PE- Laboratório Central –CCB-UFPE  
Telefones: (81) 2126-7825 ou 88580808

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra  
Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171 – Fundação HEMOPE;  
Laboratório de Hemoglobinopatias - UNILABE  
Telefones: (81) 3187-4711 ou 9138-9556

**Análise Microbiológica de Úlceras Maleolares em Pacientes Falciformes e  
Correlação com o Polimorfismo do Gene *MBL2*.**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_ declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo "Análise Microbiológica de Úlceras Maleolares em Pacientes Falciformes e Correlação com o Polimorfismo do Gene *MBL2*". Autorizo a coleta de 2 tubos de 5ml de sangue e secreção presente nas úlceras que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

1- Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo da continuidade do meu tratamento.

Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.

2- Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.

3- Garantia de acesso ao responsável pelo estudo e ao respectivo comitê de ética institucional, quando necessário.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação dos dados e ao armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Prof. Dr. Marcos André 3182-4711/9138-9556; Caroline Medeiros 8858-0808;

Consentimento para participação no estudo:

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Testemunha

Impressão Digital

## ANEXO A – PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ENVOLVENDO SERES HUMANOS DO HEMOPE



### 1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL : Nº. 029/2011

**Título do Projeto:** Análise microbiológica de úlceras maleolares em pacientes falciformes e correlação com polimorfismo no gene MBL2.

**Instituição Solicitante:** Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

**Pesquisadora:** Caroline Sanuzi Quirino de Medeiros

**Identidade:** 5970280 **CPF:** 051.187.404-95 **Telefone:** 81- 2126-7825

**Endereço:** Rua. Alaíde, 202- Cordeiro- Recife – PE – CEP:50721-080.

**Orientadora:** Dra. Rejane Pereira Neves

**Co-Orientador:** Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

**Local de Desenvolvimento do Projeto:** Centro de Ciências da Saúde da UFPE, Fundação Hemope- Diretoria de Hematologia

**Responsável Técnico do Hemope:** Dra. Valdevez Ribeiro de Andrade.

### 2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

**Objetivo Geral:** Verificar a relação entre fisiopatologia das úlceras maleolares e a infecção microbiana em pacientes portadores de anemia falciforme, correlacionando com o possível polimorfismo do gene *MBL2*.

**3 - PARECER DO RELATOR:** O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 029/2011, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

### 4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.



- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- **Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.**

Homologado na Reunião do CEP de 24/8/2011



Ana Lúcia de Sena  
Coordenadora

Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE

Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – Comitê de Ética em Pesquisa  
Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, Recife - PE - CEP: 52011-000  
cep.hemope@gmail.com- etica@hemope.pe.gov.br - Fone: (81) 3182-4771  
Fax: (81) 3182-4660

