THIAGO PAGLIARINI

Estudo dos polimorfismos do gene *DUFFY* em
pacientes com hipertensão maligna
e doadores de sangue

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Zago Novaretti

São Paulo
2008

Este trabalho é dedicado:

À minha amada mulher Mailin, que pela intensidade de sentimentos transformou minha vida e que me mostra a todo momento viver com felicidade.

Ao meu filho Ruryk, que mora no meu coração e é motivo de orgulho e alegria.

À minha mãe Rose e ao meu pai Jorge, que foram exemplos para a formação do meu caráter, ensinando-me o valor da honestidade e do trabalho.

À minha querida tia Thais, que nunca mediu esforços para fazer o bem; presença marcante na minha caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Márcia Cristina Zago Novaretti, grande estudiosa, colecionadora de inigualável experiência em imuno-hematologia, pela orientação, incentivo e tolerância.

Ao Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone, por criar todas as condições para o aprimoramento científico e pela oportunidade na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Enrique Dorlhiac-Llacer, pelo exemplo de profissionalismo e estímulo para o desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Luis Aparecido Bortolotto e ao Prof. Dr. Eduardo Moacyr Krieger, pela confiança que me foi depositada.

Ao meu inestimável amigo Eduardo, por participar diretamente da decisão mais importante da minha vida acadêmica, incentivando-me nos momentos difíceis, sempre desejando o meu sucesso.

Aos inesquecíveis amigos imuno-hematológicos Mônica, Rosely, Maricea, Juliana, Ana Paula, João, Carlos, Geraldo, Cleber, Antonio, Yuriko, Luis, Ricardo e Juliano, pelo companheirismo em todas as etapas desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Diagnóstico Sorologia da Fundação Pró-Sangue Ângela, Maysa e Márcia, pela valiosa ajuda na padronização e realização das técnicas de ELISA IL-8, utilizadas nesse estudo.

À equipe da Divisão de Coleta da Fundação Pró-Sangue, pelo suporte para o desenvolvimento da dissertação.

À “nossa” Terezinha, pela disponibilidade, simpatia e competência com que conduz a Secretaria do Serviço de Hematologia HCFMUSP.

À Eliana Costa Ponte do Departamento de Clínica Médica, pelo apoio e ajuda desinteressada em todas as etapas desse projeto.

À Rose Cler Ferreira e Angélica Belem de Souza da Secretaria de Pós-Graduação Ciências Médicas, pela afetuosa receptividade na etapa final desse trabalho.

Ao estatístico Marcos Albuquerque, pela análise dos dados e pela seriedade profissional.

Ao Serviço de Atendimento e Informação da Biblioteca Central FMUSP, em nome de Marinalva, Valéria e Fernanda, pela sempre atenciosa e gentil orientação das referencias bibliográficas.

Ao Prof. Dr. Sergio Bydlowski, Prof.Dr. Israel Bandit e Prof. Dr. Dante Mario Langhi Junior, pelas valiosas sugestões para aprimorar esse estudo.

Aos pacientes e doadores que acompanhei, pela inestimável colaboração e imprescindível contribuição, os quais tornaram o presente trabalho possível.

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de quadros

Lista de figuras e fotografias

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	07
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	08
3.1	Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy.....	08
3.1.1	Histórico do Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy.....	08
3.1.2	Antígenos Duffy.....	10
3.1.3	Freqüência dos antígenos Duffy.....	15
3.1.4	Significado clínico dos anticorpos do Sistema de Grupo Sanguineo Duffy.....	16
3.1.5	Doença hemolítica do recém-nascido.....	19
3.1.6	Gene <i>DUFFY</i>	20
3.1.7	Estrutura da glicoproteína Duffy.....	22
3.1.8	Expressão da glicoproteína Duffy nos tecidos.....	23
3.1.9	Análise função-estrutura dos antígenos Duffy.....	24
3.1.9.1	Receptor para <i>Plasmodium vivax</i>	24

3.1.9.2 Receptor de quimiocinas.....	26
3.2 Quimiocinas.....	31
3.2.1 Definição e classificação.....	31
3.2.2 Ação biológica das quimiocinas.....	32
3.3 Hipertensão.....	36
3.3.1 Definição e classificação.....	36
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos.....	38
4.2 Características da população estudada.....	40
4.2.1 Pacientes com hipertensão maligna.....	40
4.2.2 Doadores de sangue.....	42
4.3 Coleta e processamento do material.....	43
4.4 Fenotipagem eritrocitária do Sistema de Grupo sanguíneo Duffy.....	44
4.5 Extração de DNA.....	47
4.6 Quantificação de DNA.....	49
4.7 Genotipagem Duffy.....	50
4.7.1 Digestão enzimática - Styl.....	54
4.7.2 Digestão enzimática - Ban I.....	57
4.7.3 Digestão enzimática - Mspa1I.....	59
4.7.4 Digestão enzimática - MwoI.....	61
4.8 Dosagem de interleucina-8.....	63
4.9 Análise estatística.....	64

5	RESULTADOS.....	66
5.1	Análise dos grupos estudados.....	66
5.2	Frequência fenotípica, genotípica e alélica do sistema Duffy	70
5.3	Interleucina-8.....	74
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÕES.....	93
8	REFERÊNCIAS.....	94

Apêndices

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNALadder	Marcador de peso molecular
dNTP	Dideoxynucleotide
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
<i>et al.</i>	e outros
pg/mL	picograma / mililitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
ng	Nanograma
nt	Nucleotide
°C	Graus Centígrados
pb	Pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	picomol
r.p.m.	Rotações por minuto
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade
V	Volt

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Terminologia do Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy Adotada pela Sociedade Internacional de Transfusão Sangüínea.....	10
Quadro 2:	Seqüência de iniciadores utilizados para amplificação da região promotora e exon 1 e para o exon 2 do gene <i>DUFFY</i>	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática do cromossomo 1 e a região onde está localizada o gene <i>DUFFY</i>	21
Figura 2:	Fotografia do gel de agarose demonstrando a quantificação do DNA genômico de 4 amostras utilizadas no estudo. Os números 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente Lambda-DNA 500, 250, 125 e 62,5 ng/μL; a coluna 5 e 6 representam amostras com 100 ng/μL de DNA; a coluna 7 e 8 representam amostras com 300 ng/μL de DNA.....	50
Figura 3:	Representação esquemática da região flanqueada pelos iniciadores onde estão localizados os exons 1, 2 e região promotora GATA-box do gene <i>DUFFY</i> ...	51
Figura 4:	Representação esquemática da região flanqueada pelos iniciadores onde estão localizados os exons 1, 2 e região promotora GATA-box do gene <i>DUFFY</i> e os polimorfismos.....	51
Figura 5:	Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado da amplificação, compreendendo a região promotora GATA-box e o exon 1 do gene <i>DUFFY</i> , obtendo um fragmento de 189 pares de base.....	53

Figura 6:	Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado da amplificação, compreendendo o exon 2 do gene <i>DUFFY</i> , obtendo um fragmento de 392 pares de base.....	54
Figura 7:	Representação esquemática do sítio de corte da enzima Styl na região promotora GATA-box.....	55
Figura 8:	Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima Styl.....	56
Figura 9:	Representação esquemática do sítio de corte da enzima BanI no exon 2	57
Figura 10:	Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima BanI que caracteriza os alelos <i>FYA</i> e <i>FYB</i>	58
Figura 11:	Representação esquemática do sítio de corte da enzima MspA1I no exon 2.....	59
Figura 12:	Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima MspA1I que caracteriza os alelos <i>FYX</i>	60
Figura 13:	Representação esquemática do sítio de corte da enzima MwoI no exon 2.....	61
Figura 14:	Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima MwoI que caracteriza os alelos <i>FYX</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição dos pacientes com hipertensão maligna de acordo com sexo, idade e raça.....	67
Tabela 2:	Distribuição dos doadores de sangue de acordo com raça, sexo e idade.....	68
Tabela 3:	Estudo do pareamento entre o grupo de pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue) estratificado por raça, sexo e idade.....	69
Tabela 4:	Distribuição dos fenótipos do sistema de grupo sangüíneo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).....	71
Tabela 5:	Distribuição dos genótipos do sistema de grupo sangüíneo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).....	72
Tabela 6:	Distribuição dos alelos do sistema de grupo sangüíneo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).....	73
Tabela 7:	Estatísticas descritivas do nível de interleucina-8 em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).....	74

Tabela 8:	Estudo comparativo dos níveis séricos de IL-8, segundo o fenótipo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).....	75
Tabela 9:	Estudo comparativo dos níveis séricos de IL-8, segundo o genótipo <i>DUFFY</i> em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).....	76
Tabela 10:	Associação entre hipertensão maligna e as variáveis estudadas.....	77
Tabela 11:	Odds ratio ajustados obtidos pelo modelo final de regressão logística.....	78
Tabela 12:	Ajuste do modelo de linear generalizado para níveis séricos de IL-8 e genótipos <i>DUFFY</i>	79

RESUMO

Pagliarini T, Estudo dos polimorfismos do gene *DUFFY* em pacientes com hipertensão maligna e em doadores de sangue. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. xxxp

A hipertensão essencial tem alta prevalência mundial, bem como, causas genéticas e ambientais. Na busca de correlações genéticas para a hipertensão, foi descrito um potencial papel do DARC (Duffy Antigen Receptor of Chemokines) como receptor de Interleucina-8 em endotélio e que essa interação poderia contribuir para a patogênese da pré-eclampsia. O DARC está expresso em vários tecidos além da linhagem eritróide, em especial nas células endoteliais. A glicoproteína DARC carrega determinantes antigênicos e também é receptora para *Plasmodium vivax*, tendo relevância biológica significativa. Esse estudo teve como objetivo estudar a frequência fenotípica e genotípica do Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy comparando pacientes com hipertensão maligna com doadores de sangue normotensos. Foram estudadas 43 amostras de sangue de pacientes com diagnóstico de hipertensão maligna da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O grupo controle foi constituído por 100 amostras de doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Em todas as amostras foi realizada a fenotipagem Duffy, a genotipagem *DUFFY* e a dosagem de IL-8 sérica. A fenotipagem foi realizada

pela técnica em tubo. Na genotipagem *DUFFY*, foram estudadas as mutações 125G>A, 265C>T, 29 G>A e -33T>C pela técnica de PCR-RFLP. Na análise da frequência alélica encontramos que o alelo *FYB-33* foi o mais observado no grupo de pacientes com hipertensão maligna com diferença estatisticamente significativa ($p= 0,0191$). Conseguimos demonstrar uma correlação entre níveis elevados de IL-8 em pacientes com hipertensão maligna e genótipo *FYB-33/FYB-33* ($p=0,003$). Também observamos níveis elevados de IL-8 nos pacientes com hipertensão maligna quando comparados com o grupo controle (doadores de sangue), $p<0,001$. Esses resultados indicam que a IL-8 tem papel potencial na fisiopatologia da hipertensão maligna por apresentar um efeito regulatório inibitório em pacientes Duffy negativo.

Descritores: Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy; Antígenos de Grupos Sangüíneos; Hipertensão maligna; Interleucina-8; Hipertensão; Reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY

Pagliarini T, Duffy gene polymorphism study in patients with malignant hypertension and blood donors. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. xxxp

Essential hypertension has a high prevalence worldwide and has genetic and environment causes. Searching genetics correlation for hypertension, a potential role of DARC (Duffy Antigen Receptor of Chemokines) was described as an Interleukine-8 receptor in endothelium and that this interaction might contribute for the pathogenesis of pre-eclampsia. DARC is expressed in many tissues beyond the erythrocyte lineage, in special endothelium cells. DARC glycoprotein carries antigens determinants and is also *Plasmodium vivax* receptor, with a significantly biological relevance. This study had as objective to verify the phenotypic and genetic frequencies of the Duffy Blood Group System in patients with malignant hypertension and, to compare them with norm tension blood donors. Forty three patients from the Hypertension Service of the InCor of Clinical Hospital of School of Medicine of the University of São Paulo and 100 blood donors from Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo were studied. Duffy phenotyping and genotyping and IL-8 serum dosage was performed in all samples. Phenotyping tests were performed by tube technique. We studied the 125 G>A, 265 C>T, 298 G>A and -33 T>C mutations by PCR-

RFLP genotyping. The *FYB*-33 allele was the most observed in the malignant hypertension patient's group with $p=0.0191$.

We have shown a correlation in high between high levels of IL-8 in patients with malignant hypertension and *FYB*-33/*FYB*-33 genotype ($p=0.003$).

We observed also high levels of IL-8 in patients with malignant hypertension when the control group (blood donors) was compared, $p<0.001$. This results indicate that IL-8 has a potential role in malignant hypertension physiopathology due to an regulatory inhibitory effect in Duffy negative patients.

Descriptors: Duffy Blood Group System; Blood Group Antigens; Hypertension Malignant; Hypertension Malignant; Interleukin-8; Hypertension; Polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

A identificação de antígenos eritrocitários e o reconhecimento de sua importância tanto na prática transfusional como na doença hemolítica do recém nascido, consistiram grandes avanços na hemoterapia na 1ª metade do século XX.^{1, 2}

Nos últimos 20 anos, a maioria dos genes que codificam sistemas de grupos sanguíneos presentes em eritrócitos foi identificada, caracterizando seus antígenos e elucidando fenótipos variantes. Assim como os eritrócitos foram utilizados como modelo para caracterização bioquímica de membranas celulares, os genes têm se mostrado um modelo acessível para o estudo da sua expressão e diversidade. Houve assim incomparável progresso no entendimento, e na análise estrutural e funcional dos antígenos de grupos sanguíneos expressos tanto nas hemácias quanto em superfícies celulares não eritróides.³

A Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT – International Society of Blood Transfusion) reconhece 29 sistemas de grupos sanguíneos e os define como sendo quando um ou mais antígenos são

controlados por um único locus gênico ou por dois ou mais genes homólogos ligados muito proximamente, com rara ou nenhuma recombinação gênica entre eles. O sistema de grupo sanguíneo Duffy foi numerado pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea como número 008.⁴

O sistema de grupo sanguíneo Duffy foi descoberto em 1950, devido a uma aglutinina detectada no soro de um paciente hemofílico politransfundido.⁵ Esse anticorpo foi nomeado anti-Fy^a. No ano seguinte, a expressão de um antígeno antitético Fy^b na superfície dos eritrócitos foi evidenciada com a descoberta de um anti-Fy^b.⁶ Os soros anti-Fy^a e anti-Fy^b permitem a definição de três fenótipos maiores dentro da população caucasiana: Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+). A ausência dos antígenos Fy^a e Fy^b nos eritrócitos define um quarto fenótipo Fy(a-b-), raro em caucasianos.^{7,8}

Chaudhuri *et al.* mostraram que a proteína Duffy é N-glicosilada e a variação do grau de N-glicosilação provavelmente contribui para a faixa de peso molecular de 35 a 45 kDa, também nomeada glicoproteína Duffy (GPD).⁹

O gene *DUFFY* está próximo da região centromérica do cromossomo 1 e foi mapeado em 1q22-q23.¹⁰ Iwamoto *et al.* mostraram a existência de dois exons no gene *DUFFY*, e seu RNAm dá origem a um transcrito de 336 aminoácidos.¹¹ Os alelos *FYA* e *FYB* diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125 do cDNA. No alelo *FYA*, a base é guanina (G) e no alelo *FYB* a base é adenina (A), isso produz um códon para glicina (aminoácido 42) no alelo *FYA* um códon para ácido aspártico no alelo *FYB*. Essa simples

substituição de aminoácido no domínio amino-terminal da proteína é suficiente para definir os dois antígenos antitéticos.^{12, 13}

Estudos em amostras de indivíduos que apresentavam o fenótipo Fy^b enfraquecido revelaram a presença da mutação 265C>T que provoca uma mudança do aminoácido Arginina por uma Cisteína na posição 89 do gene *DUFFY* e uma mutação associada, 298G>A que é responsável por uma substituição de Alanina por Treonina no aminoácido 100 do gene *DUFFY*.^{14, 15} Portanto, o alelo *FYX*, responsável pelo fenótipo Fy^b fraco difere do alelo *FYB* por duas mutações, 265C>T e 298G>A.¹⁴ Um outro alelo foi descrito por Castilho *et al.* codificando uma mutação 145G>T, que coexiste com as mutações 265 e 298.¹⁶

A ausência de expressão do antígeno Fy^b é devido a uma mutação pontual na sua região promotora denominada GATA-box, caracterizando o alelo *FYB*-33. Em indivíduos negróides com o fenótipo $Fy(a-b-)$, essa mutação está na sua forma homozigota. Essa alteração leva a uma interrupção no fator de transcrição eritróide GATA-1, apenas no eritrócito, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos.^{17, 18, 19}

Os antígenos do Sistema Duffy foram os primeiros antígenos de grupos sangüíneos aos quais foi reconhecida uma função: a de receptor. Um dos aspectos interessantes dos antígenos Duffy é sua função de receptor de merozoítas de *Plasmodium vivax* e de *Plasmodium knowlesi*, que são respectivamente os agentes responsáveis por diferentes formas de malária no homem e no macaco.^{20, 21}

A partir de 1989 os estudos referentes ao sistema Duffy tomaram um novo impulso. A purificação da proteína Duffy e a clonagem do cDNA do gene *DUFFY*, permitiram a abordagem de estudos estruturais e funcionais.^{9, 22}

Além de receptores para plasmodium, os antígenos Duffy têm a função de receptores de alta afinidade para quimiocinas.^{23, 24}

A Interleucina-8 (IL-8) é a quimiocina ligante do DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) eritróide mais intensivamente estudado. A IL-8 é conhecida por sua habilidade de atração e ativação de neutrófilos. Após sua introdução na circulação, a IL-8 é rápida e eficientemente ligada ao DARC eritróide, ficando incapaz de ativar neutrófilos, desse modo, o DARC eritróide pode funcionar como um escoadouro para a IL-8 (e outras quimiocinas) na circulação^{25, 26}. A ausência do DARC eritróide em indivíduos Duffy negativo, consequentemente, reduz a capacidade de IL-8 ligar-se aos eritrócitos.²⁴ Nessa pesquisa utilizaremos tanto o termo antígenos Duffy como DARC.

A IL-8 é multifuncional e afeta o crescimento, diferenciação, função celular e sobrevivência das células.^{27, 28} Induz alterações vasculares na hipertensão portal através da síntese dos vaso-dilatadores óxido nítrico e prostaciclina.²⁹ Está ligado ao risco de futuro desenvolvimento de doença arterial coronariana, sugerindo que possa desempenhar um papel em condições hipertensivas.³⁰

Stallmach *et al.* reportaram um aumento de IL-8 em 13 gestantes com pré-eclampsia, comparadas com 20 gestantes normotensas em mulheres negras das Antilhas Holandesas, principalmente Curaçao.³¹ Velzing-Aartsel *et al.* concluíram que o fenótipo Duffy-negativo é mais freqüente em mulheres com

história de pré-eclampsia do que naquelas que apresentaram uma gravidez sem complicações devido ao fato do aumento dos níveis séricos ou diminuição da “clearance” de IL-8, secundário ao incremento dos níveis de TNF- α .^{32, 33}

A prevalência mundial estimada de indivíduos acometidos por hipertensão é de 20% em adultos. A hipertensão é um problema médico e de saúde pública cada dia mais relevante. Devido ao fato do risco ao paciente e gravidade da hipertensão estarem correlacionados, um sistema de classificação é essencial para a conduta quanto a agressividade do tratamento ou de intervenções terapêuticas.³⁴

A hipertensão arterial para maiores de 18 anos pode ser classificada em leve caracterizada por pressão arterial diastólica entre 90 - 99 mmHg, moderada entre 100 – 109 mmHg e grave com valor igual ou maior que 110 mmHg.³⁵

A hipertensão essencial é uma das doenças mais prevalentes no mundo e a sua etiologia é multifatorial e altamente complexa e a forma mais grave, é conhecida como hipertensão maligna.³⁶

A hipertensão maligna é caracterizada por hipertensão grave, geralmente com pressão arterial diastólica acima de 130 mmHg, retinopatia com papiledema, insuficiência renal, necrose fibrinóide de arteríolas renais e curso clínico rapidamente progressivo e fatal.³⁷

As causas genéticas desempenham importante papel na fisiopatologia da hipertensão essencial, além de diversos fatores ambientais outros já identificados, o que sugere que apesar de a hipertensão maligna ser rara, as alterações genéticas mais importantes serão nela detectadas.^{38,}

O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos que levam à hipertensão, que podem ter aplicabilidade clínica é extremamente importante, pois pode auxiliar na detecção precoce dessa condição clínica, podendo contribuir para o tratamento adequado e, conseqüentemente, reduzir as complicações dessa doença.

Na busca de correlações genéticas para a hipertensão foi constatado por Velzing-Aarts *et al.*, em 2002 um eventual papel do DARC como receptor de IL-8 em endotélio e, que essa interação, poderia contribuir para a patogênese da pré-eclâmpsia .^{38, 39}

Baseando-se nos conhecimentos apresentados acima, foi proposta essa pesquisa, com o intuito de estudar o fenótipo Duffy, genótipo *DUFFY* e níveis séricos de interleucina-8 de pacientes com hipertensão maligna, comparando-os com doadores de sangue normotensos, para estimar o valor preditivo do polimorfismo do gene *DUFFY* nessa patologia.

2 OBJETIVOS

Os principais objetivos desse estudo são comparar:

- Os fenótipos Duffy em pacientes com hipertensão maligna e doadores de sangue.
- Os genótipos *DUFFY* em pacientes com hipertensão maligna e doadores de sangue.
- Os níveis séricos de IL-8 em pacientes com hipertensão maligna e doadores de sangue.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SISTEMA DE GRUPO SANGUINEO DUFFY

3.1.1 Histórico do Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy

A descoberta do anti-Fy^a ocorreu em 1950, por Cutbush *et al.* ⁵ que descobriram uma aglutinina no soro de um paciente hemofílico politransfundido ainda não reconhecida como antígeno de grupo sangüíneo. Esse anticorpo foi denominado anti-Fy^a, em homenagem ao paciente em questão, Sr. Duffy, e reagia com 64,9% das 205 amostras de sangue testadas de indivíduos não relacionados na população inglesa. ⁷

No ano seguinte, Ikin *et al.* ⁶ descreveram o anti-Fy^b, anticorpo que define o par antitético do antígeno Fy^a.

Em 1955, Sanger *et al.*⁸ observaram que o fenótipo Fy(a-b-) era o mais comum em afro-americanos, e que, provavelmente, representava um produto de um alelo silencioso, *FY*.

Chown *et al.*³⁹ descreveram outro alelo no locus *DUFFY*, denominado *FYX*, que é co-dominante com *FYA* e recessivo para *FYB*, correlacionado com a expressão fraca do antígeno Fy^b, podendo ser detectado por métodos de adsorção e eluição.⁴⁰

Os antisoros anti-Fy^a e anti-Fy^b definem os fenótipos Fy(a+b-), Fy(a+b+), Fy(a-b+) e Fy(a-b-). Em 1971 o antígeno Fy3 foi descrito e os antígenos Fy4 e Fy5 foram reportados em 1973.^{41, 42, 43} Os antisoros que definem os fenótipos Fy3, Fy4 e Fy5 são muito raros e não existem comercialmente.

Em 1987, o primeiro anticorpo monoclonal murino anti-Fy6 foi obtido e definiu outro determinante antigênico Duffy (Fy6) presente em todas as hemácias Duffy-positivo mas ausente em células Fy(a-b-). Esse epítopo se revelou importante para estudos de estrutura-função do sistema Duffy.⁴⁴

Um dos aspectos interessantes dos antígenos Duffy é sua função de receptor de merozoítas de *Plasmodium vivax* e de *P. knowlesi*, que são respectivamente os agentes responsáveis por diferentes formas de malária no homem e no macaco. Essa função foi colocada em evidência por Miller *et al.*²⁰ em 1975, mostrando a resistência dos eritrócitos Fy(a-b-) à invasão de merozoítas de *P. knowlesi* que eram cultiváveis *in vitro* naquela época. Em 1989, Barnwell *et al.*⁴⁵ confirmaram os mesmos experimentos com *P. vivax*.

A partir de 1989 os estudos referentes ao sistema Duffy tomaram um novo impulso com a purificação da proteína Duffy e a clonagem do cDNA, permitiram a abordagem de estudos estruturais e funcionais.^{9, 22}

Quadro 1: Terminologia do Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy adotada pela Sociedade Internacional de Transfusão Sangüínea.

	Sistema Duffy	Antígenos					
		Fy ^a	Fy ^b	Fy3	Fy4	Fy5	Fy6
Símbolo	FY	FY1	FY2	FY3	FY4	FY5	FY6
Número	008	008001	008002	008003	008004	008005	008006

3.1.2 Antígenos Duffy

Os antígenos Fy^a e Fy^b são codificados por duas formas alélicas do gene *DUFFY*. Os alelos *FYA* e *FYB* diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo *FYA*, a base é guanina (G) e no alelo *FYB* a base é adenina (A). Essa troca produz um códon para glicina no aminoácido 42 no alelo *FYA*, e um códon para ácido aspártico no alelo *FYB*. Essa substituição de um aminoácido no domínio amino-terminal da proteína é suficiente para definir

os dois antígenos antitéticos.^{12, 46, 13} Essa variação leva à identificação dos fenótipos Fy(a+b-), Fy(a-b+) e Fy(a+b+).⁴⁷

Estudos com anticorpos monoclonais realizados por Wasniowska *et al.*⁴⁸ mostraram que o sítio de maior imunogenicidade para os antígenos Fy^a/Fy^b está localizado entre os aminoácidos 37 e 47 da proteína Duffy.

Tournamille *et al.* estudando 4 amostras de doadores de plaquetas com fenótipo Fy(a+b+^{fraco}), descobriram que a alteração da expressão do alelo *FYB* é devido à mutação específica no nucleotídeo 265C>T do alelo *FYX*, responsável pela expressão muito baixa do fenótipo Fy^b. Essa substituição de uma única base provoca uma mudança do aminoácido Arginina por uma Cisteína na posição 89 do gene *DUFFY*.¹⁴

Para caracterização sorológica do fenótipo Fy^b fraco, técnicas de adsorção e eluição são utilizadas, mas nem sempre essas técnicas são eficazes.

Em um estudo com 5 amostras de indivíduos com fenótipo Fy(a+b+^{fraco}) e 2 amostras Fy(a-b+^{fraco}) de indivíduos não aparentados, Olsson *et al.*¹⁵ além da mutação 265C>T, observaram em todas as amostras pesquisadas a mutação 298G>A, também associada ao alelo *FYX*. Essa mutação provoca uma substituição de Alanina por Treonina no aminoácido 100 do gene *DUFFY*.

Outros autores demonstraram sorologicamente que os antígenos Fy3 e Fy5 também têm suas expressões enfraquecidas em eritrócitos.^{49, 50, 51}

Em 2004 Castilho *et al.*¹⁶ descreveram um novo polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP - single nucleotide polymorphism) 145G>T no alelo *FYB*,

que foi encontrado juntamente com os SNPs dos nucleotídeos 265 e 298, em 2 doadores de sangue brasileiros não aparentados, um caucasiano e outro negro. Nesse estudo, foi observado que dos 361 doadores estudados, em 27 (7,5%) encontrou-se apenas a mutação 298G>A, mas nenhum dos indivíduos estudados apresentou a mutação 265C>T isoladamente.

O fenótipo Fy(a-b-) em negros mostrou ser devido a uma mutação pontual -33T>C na região promotora do gene *FYB*, chamado de GATA-box.^{17,}

¹⁸ Essa alteração leva a uma interrupção no fator de transcrição eritróide GATA, resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^b apenas no eritrócito, não alterando a expressão dessa proteína em outros tecidos. Conseqüentemente esses indivíduos podem vir a desenvolver anti-Fy^a, mas não anti-Fy^b.⁵²

Castilho *et al.*¹⁶ em 2004 observaram uma alta freqüência da mutação -33T>C (12,5%) em indivíduos brasileiros com ancestrais caucasianos, demonstrando o alto grau de miscigenação na nossa população. Foi observada também a ocorrência simultânea das mutações -33T>C, 265C>T e 298G>A (1,7%) e a ocorrência das mutações 265C>T e 298G>A em indivíduos de descendência africana, o que difere de outros relatos na literatura que apresentaram a ocorrência das mutações 265C>T e 298G>A em 2-5% da população caucasiana mas não em negros.^{15, 53, 54}

Outras mutações observadas na região GATA-box, estão relacionadas ao gene *FYA* resultando na ausência de expressão do antígeno Fy^a, esse resultado de eventos naturais é interessante encontrado em regiões

endêmicas do *Plasmodium vivax* na Nova Guiné⁵⁵ e também na região amazônica.⁵⁶

Shimizu *et al.*^{57, 58} investigaram várias etnias de regiões da Tailândia e Indonésia, verificando a alta incidência do alelo *FYA* (>0,9) e a presença do novo fenótipo Fy(a+^{fraco}b-), dados similares aos encontrados em estudos fenotípicos anteriores realizados na região do sudeste asiático e Oceania.⁵⁹ Chama a atenção que os indivíduos Fy(a+^{fraco}b-) apresentaram genotipagem *FYA/FYA* e os Fy(a-b-) apresentaram genotipagem *FYA/FYA* ou *FYA/FYB*, por PCR-RFLP utilizando as enzimas *BanI* e *StyI*, porém os mecanismos genéticos que causam esse fenótipo não foram determinados. As implicações da presença desses fenótipos encontrados ainda são desconhecidas, mas sugerem que em regiões endêmicas de malária, também há mecanismos de defesa para a infecção do *P. vivax*, distintos dos encontrados em descendentes africanos.⁵⁸

Rios *et al.*⁶⁰ relataram a análise molecular de 3 indivíduos caucasóides que apresentavam fenótipos Fy(a-b-) nos quais foram identificados anti-Fy3 em altos títulos. No primeiro caso, a genotipagem Duffy mostrou ser *FYA/FYA*, as mutações 265C>T, 298G>A e -33T>C não foram encontradas, porém uma nova mutação pontual 287G>A foi observada, provocando a substituição de 1 nucleotídeo, acarretando um códon de término ("stop" códon). O segundo paciente apresentou genotipagem *FYB/FYB*, as mutações 265C>T, 298G>A e -33T>C não foram encontradas, mas a seqüência de nucleotídeos do exon 2 do gene *DUFFY* mostrou outra mutação nova, 407G>A, que causa um códon de

término prematuro no aminoácido de posição 136. O terceiro paciente, previamente estudado por Mallinson *et al.* ⁴⁶ apresentava genótipo *FYA/FYA*, as mutações 265C>T, 298G>A e -33T>C não foram encontradas e a seqüência de nucleotídeos do exon 2 do gene *DUFFY* mostrou uma previamente não reportada, mutação 408G>A que causa um códon de término prematuro no aminoácido de posição 136. Segundo os autores, essas mutações mostraram ser eventos espontâneos, pois foi observada no alelo *FYA* e no alelo *FYB*.

O antígeno Fy3, descrito por Albrey *et al.*, ⁴¹ é resistente aos tratamentos com tripsina, DTT 0,2M, α -quimiotripsina, papaína, sialidase e pronase.⁶¹ O epítipo conformacional Fy3 está localizado na terceira alça extracelular da glicoproteína Duffy, e seus determinantes antigênicos foram demonstrados por ensaios com anticorpos monoclonais serem entre os aminoácidos 281 e 285.^{48, 62}

Outros epítipos relativos à glicoproteína Duffy foram definidos por raros soros humanos, como os antígenos Fy4 e Fy5.^{48, 62}

O antígeno Fy4 foi definido por Behzad *et al.* ⁴² em 1973, relatando um anticorpo que reagia somente com hemácias Fy(a-b-) de indivíduos com descendência africana. No mesmo ano, Colledge *et al.* ⁴³ relataram o anti-Fy5, definindo o antígeno Fy5 como tendo uma possível interação com as proteínas Rh e Duffy. A raridade desses anticorpos impediu o progresso na caracterização dos epítipos correspondentes.

O antígeno Fy6, reconhecido por anticorpos monoclonais de classe IgG1 Kappa, foi mapeado na alça amino-terminal da proteína Duffy. É resistente a

tratamentos com tripsina, DTT 0,2M e sialidase e sensível ao tratamento com papaína, α -quimiotripsina e pronase.^{44, 63,64} Relacionado com a suscetibilidade à invasão do *P. vivax*, Fy6 está presente nas hemácias, com exceção das Fy(a-b-), numa frequência semelhante a do Fy3.⁴⁴

Estudos com anticorpos monoclonais anti-Fy6, mostraram que a região imunodominante do epítopo linear Fy6 é o heptapeptídeo QLDFEDV na posição 19-25 da glicoproteína Duffy.

Utilizando técnica de citometria de fluxo, Woolley *et al.*⁶⁵ descreveram que a expressão de antígenos Duffy era maior em reticulócitos do que em eritrócitos maduros. A avaliação da expressão dos antígenos Duffy nos reticulócitos pode ser de valia no entendimento de como essa expressão é modulada em respostas inflamatórias agudas como cirurgias ou sepsis.

3.1.3 Frequência dos antígenos Duffy

Nos diversos estudos populacionais referente à estrutura dos antígenos Duffy, observou-se a grande diversidade de distribuição dos determinantes antigênicos Duffy, nos diversos grupos étnicos, mostrando ser uma característica desse sistema de grupo sanguíneo.

Em um estudo realizado por Novaretti *et al.*⁶⁶ em doadores de sangue na cidade de São Paulo, a frequência fenotípica encontrada, para o sistema de grupo sanguíneo Duffy foi de 19,8% em caucasóides e 14% em negros para o

fenótipo Fy(a+b-). Quanto ao fenótipo Fy(a+b+) a casuística foi de 41,4% para caucasóides e 1,6% para negros. O fenótipo Fy(a-b+) observado foi de 37,8% para caucasóides e 17,5% para negros. Em caucasóides a freqüência do fenótipo Fy(a-b-) foi de 1,1%, enquanto que para os negros foi de 66,9% sendo esse fenótipo considerado um marcador de raça negra.

Os determinantes antigênicos Fy^a são prevalentes entre chineses, japoneses e melanésios, porém apresenta baixa freqüência entre negros africanos.^{57, 58}

No entanto o antígeno Fy^b é mais abundante na população caucasóide do que em asiáticos e negros africanos e americanos e que o fenótipo Fy(a-b-) é extremamente raro fora da população negra.^{20, 67}

Sandler *et al.*⁶⁸ investigando a origem da hemoglobina S em dois grupos nativos de sicilianos brancos, encontraram o fenótipo Fy(a-b-) em 11% de indivíduos não relacionados, mostrando que a hemoglobina S é somente um dos genes africanos múltiplos atuais em populações brancas contemporâneas.

3.1.4 Significado clínico dos anticorpos do Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy

Os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b são clinicamente significantes e podem causar reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias e também podem levar à doença hemolítica do recém-nascido.⁶⁹

Anti-Fy^a e anti-Fy^b são predominantemente anticorpos de subclasse tipo IgG1. Em uma série de estudos Szymanski *et al.*⁷⁰ verificaram que a maioria dos anticorpos anti-Duffy era composta de IgG1, 18% eram IgG2 e 25% eram IgM.

O anti-Fy^a é mais freqüentemente produzido a partir de sensibilização por transfusão sangüínea do que por gestação e, até o momento não foi demonstrado ser de ocorrência natural. Sua freqüência é aproximadamente três vezes menor que o anti-K. Cerca de 50% dos anti-Fy^a ativam complemento acima do estágio C₃.⁷¹

Já o anti-Fy^b é cerca de vinte vezes menos comum que o anti-Fy^a e geralmente é encontrado em associação com outros anticorpos. Um exemplo de ocorrência natural de um potente anti-Fy^b foi descrito por Issit *et al.*⁷². Também há relato de um caso de reação transfusional hemolítica devido à anti-Fy^b causado por resposta imune primária.⁷³

Os anticorpos Anti-Fy3 descrito por Albrey *et al.*⁴¹ e anti-Fy5 descrito por Colledge *et al.*⁴³ são anticorpos raros detectados em todos os eritrócitos exceto em fenótipos Fy(a-b-). Esse último não reage também com eritrócitos Rh_{null}.⁵³

O anti-Fy3 pode causar reação transfusional hemolítica imediata e tardia e o anti-Fy5 pode causar reação transfusional hemolítica tardia e ambos não foram implicados em doença hemolítica do recém-nascido até o momento.⁶⁹

O único exemplo de anti-Fy4 descrito em 1973 por Behzad *et al.*⁴² reagia com todos os eritrócitos com fenótipo Fy(a-b-) de negros e com a maioria dos fenótipos Fy(a-b+) e Fy(a+b-) da mesma etnia. O anti-Fy4 não reagia com

células Fy(a+b+) de negros nem com vários eritrócitos deste fenótipo em brancos.

Em 1982 Palatinik *et al.*⁷⁴ descreveram um anticorpo que os autores denominaram anti-Fs, que reagia preferencialmente com células Fy(a-b-), em uma mulher mulata brasileira com fenótipo Fy(a+b+), mas que não foi reportado novamente na literatura até agora.

Em 1987 Nichols *et al.*⁴⁴ descreveram o primeiro anticorpo monoclonal, que definiu o novo epítipo Fy6 e foi produzido por imunização de camundongos com eritrócitos humanos. Os anticorpos anti-Fy6 monoclonais são produzidos e usados como instrumentos que auxiliam tanto no isolamento da proteína Duffy, quanto para a clonagem desse gene.^{22, 48, 75, 76}

Para fins transfusionais é recomendado que quando anticorpos Duffy forem identificados em amostras de sangue de pacientes, ou ainda naqueles que, apesar de não mais os demonstrarem no soro tiverem histórico dos mesmos, seja selecionado sangue antígeno Duffy negativo. Em casos de anti-Fy3 e anti-Fy5, deve-se selecionar sangue com fenótipo Fy(a-b-) e para esse último pode-se também selecionar sangue Rh_{null} para transfusão.⁶⁹

A importância do estudo por genotipagem de indivíduos com fenótipo Fy(a-b-) se faz necessária em pacientes com anemia falciforme ou cronicamente transfundidos, para melhor seleção de unidades de sangue a serem utilizadas, afim de propiciar otimização do uso de unidades Fy(a-b-).¹⁹

3.1.5 Doença hemolítica do recém-nascido

Tanto anti-Fy^a como anti-Fy^b podem causar doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), geralmente não levam à morbidade significativa e não são freqüentes. Entretanto há relatos em que foram necessárias transfusões intra-útero e ex-sanguíneo transfusão.^{77, 78, 79, 80, 81}

Os antígenos Duffy são detectados em eritrócitos de fetos entre 6 e 7 semanas de vida e estão bem desenvolvidos ao nascimento. E que a quantidade desses antígenos não varia durante a vida.^{72, 82}

O primeiro caso descrito de transfusão intra-útero devido à incompatibilidade materno-fetal por anti-Fy^a foi descrito por Cook *et al.*⁸³ em 1984, mas após o nascimento esse recém-nascido não necessitou de transfusão de concentrado de hemácias, apresentando somente um teste de antiglobulina direto fracamente positivo.

Em estudo realizado por Geifman-Holtzman *et al.*⁸⁴ em 452 mulheres em idade reprodutiva, encontraram anti-Fy^a em 5,4% e anti-Fy^b em 0,2%.

É possível a detecção de fetos em risco de desenvolver DHRN pela determinação do genótipo Duffy em líquido amniótico.⁸⁵

3.1.6 Gene *DUFFY*

O gene *DUFFY* localiza-se próximo à região centromérica do cromossomo 1⁸⁶. Inicialmente, o locus *DUFFY* foi localizado na região 1q21-25 por análise de ligação.⁸⁷ Posteriormente, o cDNA correspondente ao mRNA da proteína Duffy foi clonado a partir de uma biblioteca de medula óssea e seqüenciado,²² sendo então o gene *DUFFY* mapeado em 1q22-q23.¹⁰

Acreditava-se que esse gene consistia de apenas 1 exon, revelando uma estrutura primária de um polipeptídeo altamente hidrofóbico, contendo uma seqüência nonapeptídica N-terminal (MASSGYVLQ) composto de 338 aminoácidos chamado de transcrito menor.^{12, 88} Um longo estudo subsequente revelou a presença de um outro exon que contém seqüências codificadoras não traduzidas.

Esse exon pode ser unido (após “splicing”) ao segundo exon (exon 2) para dar origem a um transcrito de 336 aminoácidos, contendo uma seqüência de um heptapeptídeo N-terminal (MGNCLHR) chamado de transcrito maior. Iwamoto¹¹ nesse estudo determinou os níveis relativos da expressão dos 2 *DUFFY* mRNAs distintos verificando uma predominância do transcrito maior nas células eritróides e em todos os órgãos estudados.

Desde a descoberta em 1995, feita por Iwamoto *et al.*¹³ que o gene *DUFFY* é constituído de dois exons, os nucleotídeos são numerados utilizando o mRNA “spliced”; assim, o primeiro nucleotídeo do códon de iniciação da

tradução (AUG) é o nucleotídeo nº1.⁸⁹ Numerando-se dessa forma, evita-se as inconsistências criadas por diferentes tamanhos de 5'-UT aos diferentes sítios de iniciação da transcrição como descrito por Tournamille *et al.*¹⁷ e Iwamoto *et al.*¹¹ Em nível protéico a Metionina é numerada como nº 1.

Figura 1: Representação esquemática do cromossomo 1 e a região onde está localizada o gene *DUFFY*.

3.1.7 Estrutura da glicoproteína Duffy

Inicialmente, Moore *et al.*⁹⁰ mostraram que quando hemácias Fy(a+b-) com superfície radio-iodo marcadas eram incubadas com anti-Fy^a antes da solubilização em detergente, uma proteína de 35 a 43 kD era especificamente imuno precipitada.

Em 1984, Hadley *et al.*⁹¹ utilizando técnica de “immunoblotting” com um soro anti-Fy^a potente, identificaram uma proteína com aparente massa molecular de 35-43 kDa.

Já Nichols *et al.*⁴⁴ utilizando o soro monoclonal murino anti-Fy6, observaram que este reage com uma proteína de banda larga de 36-46 kDa em “immunoblots” de proteínas de membrana eritrocitárias detergente-solúveis.

Finalmente, um estudo por desialização da membrana do eritrócito por neuraminidase, resultou numa alteração da mobilidade eletroforética da proteína Fy^a de 35 kD para 43 kD, sugerindo que a proteína Duffy é uma glicoproteína.⁹²

Chaudhuri *et al.*⁹ mostraram que a proteína Duffy é N-glicosilada e a variação do grau de N-glicosilação provavelmente contribuem para a faixa de peso molecular de 35 a 45 kDa, também chamada de GPD (glicoproteína Duffy). Embora esse estudo tenha deduzido que a seqüência de aminoácidos dos antígenos Duffy era uma proteína de nove passagens transmembrânicas, Neote *et al.*⁸⁸ mostraram a presença de sete hélices hidrofóbicas, sugerindo uma topologia na qual existem um domínio amino-terminal extra-celular, três alças

extracelulares, três alças citoplasmáticas e um domínio coboxi-terminal citoplasmático, demonstrando que a glicoproteína Duffy é uma proteína de sete passagens transmembrânicas. O domínio extracelular N-terminal da proteína Duffy compreende 60 aminoácidos, as três alças extracelulares compreendem os resíduos de aminoácidos 119-129, 189-206 e 267-288.

Utilizando soros humanos anti-Fy^a, anti-Fy^b e anti-IgG ferritina-marcada, Masouredis *et al.*⁹³ estimaram que hemácias Fy(a+b-) e Fy(a-b+) carregam entre 13.000 e 14.000 sítios antigênicos Fy^a e Fy^b, respectivamente. Como esperado, hemácias Fy(a+b+) tem a metade do número de sítios Fy^a que nas hemácias de fenótipo Fy(a+b-).

Recentemente, foram elaborados modelos estruturais da proteína DARC, com a construção de modelos em três dimensões, proporcionando um maior conhecimento de suas funções.^{94, 95}

3.1.8 Expressão da glicoproteína Duffy nos tecidos

A glicoproteína Duffy é expressa em diversos tecidos não eritróides como rim, baço, coração, pulmão, músculo, duodeno, pâncreas, placenta, cérebro, intestino, glândula tireóide e em células de Purkinje do cerebelo.^{12, 64, 96}

As células responsáveis pela expressão de Duffy nesses tecidos são as células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares, exceto no cérebro, onde a expressão Duffy está localizada nas células de Purkinje.^{97, 98, 99}

3.1.9 Análise função-estrutura dos antígenos Duffy

3.1.9.1 Receptor para *Plasmodium vivax*

A discussão sobre a função dos antígenos eritrocitários Duffy, iniciou-se em 1975 quando Miller *et al.*²⁰ que sugeriram que os determinantes antigênicos Fy^a ou Fy^b poderiam ser receptores para *Plasmodium knowlesi* e que a resistência à invasão do merozoíto, em negros, devia-se ao fenótipo Duffy negativo.²¹

Para um melhor entendimento do envolvimento dos antígenos Duffy na fisiopatologia do *Plasmodium*, iremos brevemente discorrer sobre o ciclo de vida da malária.

A malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, e as espécies que afetam o ser humano são o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*. No caso brasileiro, destacam-se as três primeiras espécies. O plasmódio infecta alternadamente um hospedeiro vertebrado e invertebrado. O vetor é a fêmea do mosquito *Anopheles*. A fêmea do *Anopheles* se alimenta de sangue infectado com gametócitos promovendo o processo de fertilização, produzindo zigotos que se transformam em formas invasivas que crescem e se dividem, produzindo milhares de esporozóitos invasivos, migrando pelo corpo e invadindo as glândulas salivares. A fêmea, ao se alimentar, inocula os esporozóitos no

sangue do homem que, migrarão rapidamente para os hepatócitos, transformando-se em trofozoítos hepáticos onde amadurecem e dividem-se formando milhares de merozoítas. Os hepatócitos se rompem liberando os merozoítas na circulação iniciando o ciclo eritrocítico. Essa parte do ciclo de vida desse parasita não produz sintomas no hospedeiro. No ciclo eritrocitário, os merozoítas desenvolvem-se em trofozoítas formando os esquizontes. Esses últimos quando maduros, levam à ruptura da hemácia que libera merozoítos capazes de reinfectar novas hemácias. Esse estágio do ciclo está associado com sintomas clínicos. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos tornando-se infectantes aos mosquitos.¹⁰⁰

O mecanismo de entrada no eritrócito pelo *Plasmodium* foi estudado por Aikawa *et al.*¹⁰¹ que observaram por microscopia eletrônica, que a porção apical do merozoíto faz o contato inicial com o eritrócito, criando uma pequena depressão na membrana. Essa área começa a espessar e forma uma junção com a membrana do merozoíto. Então o merozoíto entra na superfície do eritrócito por invaginação. Após a entrada completa do *Plasmodium*, o orifício de entrada fecha-se atrás dele. Essa junção tem importância crucial para a invasão do parasita no eritrócito.¹⁰²

No entanto parece haver outros mecanismos de invasão celular pelo *P.vivax*. Recentemente, foram apresentados relatos da transmissão do *P.vivax* entre indivíduos caracterizados como antígeno Duffy negativo no Kenia e na Amazônia brasileira.^{103, 104}

3.1.9.2 Receptor de quimiocinas

As pesquisas sobre citocinas e seus receptores convergiram na investigação dos antígenos de grupo sanguíneo Duffy, mostrando uma importante função fisiológica dessa glicoproteína.

As quimiocinas dessas famílias de citocinas, são produzidas por leucócitos e por tipos de células teciduais outros como as endoteliais, epiteliais e fibroblastos.^{105, 106}

Cada quimiocina tem um receptor específico na qual se liga com alta afinidade. Em 1991, Darbonne *et al.*²³ descobriram um novo receptor de quimiocinas nos eritrócitos. Revisando a topografia dos receptores de quimiocinas e, analisando o repertório conhecido de ligantes para essa nova descoberta, verificaram que esse novo receptor eritróide era um ligante da família de C-X-C com alta afinidade principalmente para Interleucina-8 (IL-8), e C-C com alta afinidade para MCP-1 (Proteína Quimotática de Monócito do tipo 1), MIP-1 (Proteína Inflamatória de Macrófago do tipo 1) e RANTES (Células Expressas e Secretadas Reguladas na Ativação).^{107, 108, 109}

Horuk *et al.*²⁴ mostraram em um estudo sobre receptores de quimiocinas multiespecíficos em eritrócitos humanos, que a IL-8 liga-se minimamente a eritrócitos Duffy negativos, que anticorpos monoclonais para antígenos Duffy bloqueavam a ligação de IL-8 em eritrócitos Duffy positivo, e que a IL-8 também impedia a ligação e a invasão por *P. knowlesi* em hemácias, levando a diversas

linhas de evidências e, por fim indicando que os antígenos de grupo sanguíneo Duffy são receptores de quimiocinas.

Em 1994 foi observado também que a organização dos dois exons do gene *DUFFY* é a mesma encontrada nos genes de outros receptores de quimiocinas. A partir de então, os antígenos eritrocitários Duffy foram denominados DARC (Duffy Antigen Receptor Chemokines).^{88, 110, 111}

A IL-8 é um dos ligantes do DARC eritróide mais intensivamente estudado, é de baixo peso molecular, com aproximadamente 8kDa. É produzida pela maioria das células do organismo, particularmente por macrófagos e células endoteliais, estando envolvida na migração celular. A IL-8 é conhecida por ser um indutor de quimiotaxia para neutrófilos.¹¹² Após sua introdução na circulação, a IL-8 é rápida e eficientemente ligada ao DARC eritróide, ficando incapaz de ativar neutrófilos e desse modo, o DARC eritróide pode funcionar como um “escoadouro” para a IL-8 lançada na circulação.^{25, 26}

Assim, a absorção de IL-8 nos eritrócitos pelo DARC pode funcionar como uma limitante da estimulação de leucócitos pela diminuição da IL-8 sanguínea.²³

Conseqüentemente, a ausência do DARC eritróide em indivíduos Duffy negativo, reduz a capacidade de ligação da IL-8 aos eritrócitos.²⁴

O significado biológico do DARC nos eritrócitos, inicialmente pareceu questionável, devido à falta de associação entre doenças e fenótipo Duffy negativo.⁸⁸ Porém, a relação função-estrutura e localização do DARC na fisiologia normal e patológica ainda permanecem um campo vasto para novas descobertas.

A localização do DARC nas células endoteliais das vênulas pós-capilares aliada à sua capacidade de fixar as quimiocinas, sugere que essa proteína pode ter um papel na cascata inflamatória, participando na formação do gradiente de quimiocinas que permite lançar os linfócitos na circulação para os sítios de inflamação.¹¹³ Estudos realizados por Middleton *et al.*¹¹⁴ mostraram que o DARC estava implicado na transcitose e na apresentação de IL-8 produzidas pelas células epiteliais para a superfície luminal das células endoteliais das vênulas pós-capilares.

Recentemente foi demonstrado, usando sistemas *in vivo* e *in vitro*, que a glicoproteína DARC aumenta a transmigração de neutrófilos e o transporte de quimiocinas através do endotélio.^{115, 116, 117} Entretanto, o exato mecanismo molecular da migração de leucócitos transendotelial DARC-dependente, permanece interrogado.

A expressão aumentada do RNAm da proteína Duffy durante condições inflamatórias no rim, sugere que os antígenos Duffy são biologicamente relevantes como ligantes de quimiocinas durante processos inflamatórios.^{118, 119}

Seegerer *et al.*¹²⁰ observaram o aumento da expressão de DARC em pacientes que apresentavam rejeição celular e humoral de transplante renal associado à maior deposição da fração C4d em capilares peritubulares.

Em estudo sobre a influencia dos fenótipos Duffy na evolução de pacientes transplantados renais, foi observado diminuição da função renal no pós transplante associado ao fenótipo F(a-b-).¹²¹

Também em 2003, Lee *et al.* Reportaram que a expressão dos antígenos Duffy estava aumentada nos leitos vasculares e nos alvéolos pulmonares durante quadro de pneumonia supurativa, sugerindo que os antígenos Duffy apresentavam um papel funcional no parênquima pulmonar durante o processo inflamatório.¹²²

Foi demonstrado ainda que os receptores DARC são receptores inflamatórios seletivos e não homeostáticos, fornecendo evidências que as quimiocinas ligantes ao antígeno Duffy são padrão em células endoteliais de tecidos inflamados e não em tecidos íntegros.¹²³

Além das patologias descritas anteriormente, outros artigos, demonstram que os receptores DARC podem estar envolvidos na angiogênese do câncer. Nesse processo, a angiogênese tumoral tem por característica a rápida resposta do sistema vascular ao aumento da necessidade metabólica do tecido tumoral, aumentando a microvascularização e o recrutamento de células endoteliais progenitoras circulantes, sendo esse processo muito controlado devido ao alto custo metabólico da angiogênese, ocorrendo somente quando for necessário. No caso do tumor, esse controle estrito é perdido, levando a uma angiogênese aberrante.^{124, 125}

A angiogênese é essencial em diversos processos fisiológicos como a embriogênese, reparação de ferimentos e ciclo menstrual e processos patológicos como o crescimento tumoral e metástase.

Em cada uma das etapas do angiogênese, os mecanismos exatos e os mediadores específicos que permeiam estes eventos, permanecem

desconhecidos. Entretanto, quimiocinas CXC, como a IL-8, demonstraram ter um papel potencial neste processo.¹²⁶ Em 2007, Xu L *et al.* demonstraram que receptores DARC nas células endoteliais parecer ter um papel direto na regulação da angiogenese.¹²⁷

Com base em estudos epidemiológicos que mostram que a incidência do câncer de próstata em afro-americanos é 60% maior do que aquela encontrada nos caucasianos, com uma taxa de mortalidade duas vezes mais elevada. Moore *et al.* e Lentsch *et al.* demonstraram que dado a importância das quimiocinas angiogênicas no desenvolvimento da rede vascular tumoral e o DARC ter propriedades ligantes com alta afinidade a IL-8, a possibilidade de homens afro-americanos com ausência do DARC eritróide, pode ser considerado um fator de predisposição genético para maior incidência e mortalidade para o câncer de próstata.^{128, 129}

Foi também relatado que, há fortes evidências do potencial terapêutico da glicoproteína DARC, sendo uma oportunidade para o controle farmacológico ou da terapia gênica das funções desse receptor.^{127, 130}

Finalmente, pode-se dizer que nos últimos dez anos, os progressos revelados pelas pesquisas conduzidas tanto no Brasil, como internacionalmente, tiveram forte impacto para melhor entendimento desse sistema de grupo sanguíneo embora, muito há que se desvendar em especial quanto à função biológica dos antígenos do sistema Duffy.

3.2 Quimiocinas

3.2.1 Definição e classificação

As quimiocinas constituem uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas responsáveis pela movimentação dos leucócitos, incluindo sua migração para locais de inflamação tecidual a partir do sangue.

As quimiocinas são pequenos polipeptídeos de 8 a 12 kDa que contêm duas alças dissulfeto internas. Cerca de 50 quimiocinas diferentes já foram identificadas, sendo classificadas em famílias com base no número e na localização dos resíduos de cisteína N-terminais.¹⁰⁵ As duas principais famílias são a das quimiocinas CC, nas quais resíduos de cisteína são adjacentes, e a família C-X-C, na qual esses resíduos são separados por um aminoácido. Uma terceira família tem como única representante a fractalkina (CX₃CL1), em que a característica estrutural é a presença de duas cisteínas separadas por três aminoácidos (CX₃C). Finalmente, a quarta família, que também possui apenas um representante, a linfotacina (XCL1), possui uma única cisteína (família C).

Essas proteínas, as quimiocinas, podem ainda ser separadas em duas categorias dependendo da forma como são expressas: 1) constitutivas ou, 2) induzidas. As quimiocinas constitutivas são produzidas normalmente em vários tecidos e recrutam leucócitos, principalmente linfócitos, para esses tecidos na

ausência de inflamação. As quimiocinas induzidas (ou inflamatórias) são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios, e recrutam leucócitos para locais de inflamação.¹³¹

As quimiocinas atuam através de receptores transmembranas de alta afinidade exposto na superfície de células circulantes. Onze receptores diferentes para quimiocinas CC (chamadas CCR1 a CCR11) e seis quimiocinas CXC (chamadas CXCR1 a CXCR6) já foram identificados. Os receptores de quimiocinas possuem sítios de ligação que podem ser específicos (CCR9, CXCR6), mas, comumente, o mesmo receptor pode ser alvo de ligação de várias quimiocinas do mesmo grupo.^{132, 133}

3.2.2 Ação biológica das quimiocinas

Originalmente as quimiocinas foram estudadas devido ao seu importante papel nos processos inflamatórios; mas atualmente, sabe-se do papel crucial exercida por essas moléculas na estimulação do movimento das células mononucleares pelo corpo e na migração destas do sangue periférico para os tecidos, contribuindo na resposta imune adaptativa e/ou na pantogênese de várias doenças.¹³⁴

Os receptores de quimiocinas são expressos em leucócitos, com o maior número de receptores diferentes vistos em linfócitos T. A expressão dos receptores de quimiocinas pode definir subtipos de linfócitos T. Além disso,

linfócitos T periféricos maduros expressam diferentes receptores de quimiocinas dependendo do seu fenótipo funcional. Por exemplo, células T helper 1 (Th1), que sintetizam interleucinas-2 e interferon gama, e mediam a ativação de fagócitos, expressam CXCR3, CCR2 e CCR5. Linfócitos T helper 2 (Th2), que produzem interleucina-4, interleucina-5 e são mediadores da produção de anticorpos pelos linfócitos B, expressam CCR2, CCR3 e CCR4. Estas diferenças determinam, em parte, o tipo de resposta imune que irá se desenvolver em um sítio de inflamação.^{135, 136}

Após serem ativados pelas quimiocinas, os receptores das quimiocinas iniciam uma complexa cascata de sinalização que leva à ativação de moléculas de integrina na superfície celular. As integrinas são moléculas essenciais para que ocorra a adesão das células de defesa aos tecidos envolvidos nos processos inflamatórios.¹³⁷

Além das funções como agente quimiotático de linfócitos, os estudos com as quimiocinas e seus receptores estão revelando outros importantes papéis para estas moléculas. Alguns receptores de quimiocinas, entre eles o CCR5, são os principais co-receptores para certas cepas do vírus da imunodeficiência humana (HIV).^{138, 139} Estudos recentes têm identificado polimorfismos em genes que codificam as quimiocinas, o que poderia interferir na sua função. Os estudos mais aprofundados abordam a deleção do CCR5 Δ 32 e a infecção pelo HIV. Pacientes com esta mutação são protegidos da infecção pelo vírus.¹⁴⁰

Algumas quimiocinas estão envolvidas na angiogênese por exercerem efeito quimiotático em células endoteliais (por exemplo, CXCL8/IL-8, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL1/GRO- α , CXCL2/GRO- β , CXCL3/GRO- γ), enquanto outras podem exercer um efeito antiangiogenico (CXCL4/PF-4, CXCL10/IP-10 e CXCL9/MIG).¹⁰⁵ Outro efeito atribuído às quimiocinas é a sua interferência, tanto estimulando quanto inibindo, a hematopoiese; ação, essa, que vai depender da maturidade das células progenitoras envolvidas.¹⁰⁵

Quimiocinas têm sido relacionadas a metástases tumorais e, contraditoriamente, a inibição do crescimento de células tumorais; infecções e doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla.^{141, 142, 143, 144, 145} Níveis elevados de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES e CXCL10/IP-10 tem sido encontrados no sistema nervoso central de pacientes com esclerose múltipla e em modelos experimentais desta doença.^{146, 147} Em trabalho realizado por Moreira e colaboradores pacientes com esclerose múltipla ativa apresentaram níveis elevados de CXCL10/IP-10 no líquido, enquanto que os níveis de CCL2/MCP-1 foram significativamente menores quando comparados a controles assintomáticos.¹⁴⁸ Em pacientes com a forma aguda da coreia de Sydenham, observamos elevação dos níveis séricos de CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10.¹⁴⁹ Níveis elevados de CXCL8/IL-8 têm sido relatados em várias doenças inflamatórias sistêmicas como na sarcoidose e na sepse.^{150, 151} Níveis teciduais aumentados de CXCL8/IL-8 e anticorpos séricos contra essa quimiocina parecem elevados na colite ulcerativa em atividade.¹⁵²

Traves e colaboradores realçam a importância das quimiocinas na patogênese das doenças pulmonares obstrutivas crônicas e o papel dos antagonistas dos receptores de quimiocinas como uma possibilidade terapêutica possível.¹⁵³ No diabetes melitus, estudos revelaram que as quimiocinas podem interferir no acúmulo de células adiposas, aumentando assim a resistência periférica à insulina.¹⁵⁴ Estudo experimental mostrou que animais geneticamente modificados, que não expressam a quimiocina CCL2/MCP-1 e o receptor CCR2, possuem a gravidade atenuada da aterosclerose induzida por dieta.¹⁵⁵ Trabalhos revelaram que a produção de quimiocinas pelas células do tecido renal estaria envolvida tanto na homeostase do órgão, quanto na gênese de doenças inflamatórias glomerulares ou túbulo-intestinais.^{156, 157} Portanto, as quimiocinas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos do organismo.

3.3 Hipertensão maligna

3.3.1 Definição e classificação

A prevalência mundial estimada de indivíduos acometidos por hipertensão é de 20% em adultos. A hipertensão é um problema médico e de saúde pública com relevância cada vez maior. Considera-se hipertenso o paciente que apresentar além do nível de pressão arterial, os fatores de risco, a lesão de órgãos alvo e as comorbidades associadas para diagnóstico e início de terapia. Devido ao fato do risco ao paciente e severidade da hipertensão estarem correlacionados, um sistema de classificação é essencial para a conduta quanto a agressividade do tratamento ou de intervenções terapêuticas.³⁴

A hipertensão essencial é uma das doenças mais prevalentes no mundo , sua etiologia é multifatorial e altamente complexa.³⁴

A hipertensão arterial em indivíduos maiores de 18 anos pode ser classificada em leve caracterizada por pressão arterial diastólica entre 90 - 99 mmHg, moderada entre 100 – 109 mmHg e grave com valor igual ou maior que 110 mmHg.³⁵

A hipertensão maligna é a forma mais grave, é caracterizada por hipertensão, geralmente com pressão arterial diastólica acima de 130 mmHg, retinopatia com alterações moderadas associadas à lesão hipertensiva no nervo óptico como edema do disco ou “edema de papila”. Acredita-se que o

mecanismo da lesão dependa da combinação de vários fatores: a presença de isquemia causada por alterações vasculares e o aumento da pressão intra-ocular e/ou da pressão intra-craniana diminuindo o fluxo axoplasmático nas fibras nervosas, causando o edema hipertensivo do nervo óptico. A presença do edema de papila classifica o paciente como portador de hipertensão maligna, associada à insuficiência renal, necrose fibrinóide de arteríolas renais, excluídos causas secundárias a hipertensão, bem como doença sistêmica e curso clínico rapidamente progressivo e fatal.^{37, 158}

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Esse estudo prospectivo, tipo caso-controle, experiência de um único centro, comparou os resultados de fenotipagem e genotipagem Duffy e ainda Interleucina-8 entre pacientes com diagnóstico confirmado de hipertensão maligna e doadores de sangue.

Os pacientes com diagnóstico de hipertensão maligna foram recrutados no ambulatório da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas entre 21 de março de 2005 e 24 de agosto de 2006 e os doadores de sangue na Divisão de Coleta da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, entre 07 de fevereiro de 2007 e 08 de abril de 2007.

O grupo de pacientes com hipertensão maligna foi pareado com o grupo controle, em relação a sexo, idade e raça.

Os participantes deste estudo foram classificados com caucasóides e negróide de acordo com as características antropológicas (pigmentação da

pele, tipos de cabelo, lábio e nariz) e pela informação quanto à procedência e a quanto às características antropológicas de seus ancestrais (pai, mãe, avós paternos e avós maternos). O grupo negróide foi dividido em mulatos e negros. Foi classificado com caucasóide todo aquele cujas características antropológicas observadas e todos os ancestrais estudados eram caucasóides. Foi classificado como negro aquele que apresentava todas as características antropológicas negras e todos os ancestrais negros. Foi classificado como mulato aquele que apresentava pelo menos uma característica antropológica negróide, mas não todas e/ou pelos menos um e seus ancestrais estudados negro, mas não todos. Não participaram deste estudo indivíduos asiáticos.^{159, 160, 66}

Os dados demográficos e epidemiológicos foram coletados durante a entrevista por um único observador. Em caso de dúvida, os participantes foram avaliados independentemente por mais de um observador treinado e capacitado para tal, bem como foram estudados pormenores quanto à origem de seus ancestrais, tendo sido o participante classificado racialmente, após avaliação conjunta dos observadores. A entrevista foi realizada seguindo um questionário padronizado, conforme apêndice 4.

A entrevista dos doadores de sangue foi realizada após a avaliação clínica e voto de auto-exclusão, antes da doação de sangue.

Esse estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética da Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,

do Instituto do Coração e da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.
(Apêndice 1)

A todos os participantes, o termo de consentimento livre e esclarecido foi apresentado fornecendo todas as explicações necessárias ao bom entendimento da pesquisa (Apêndice 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido) e somente após assinatura do termo foram incluídos nesse estudo.

As amostras coletadas foram utilizadas para uso único e exclusivo desse estudo. Somente os pesquisadores envolvidos neste estudo tiveram acesso às informações sobre os procedimentos realizados, bem como aos resultados obtidos.

4.2 Características da população estudada

4.2.1 Pacientes com hipertensão maligna

O grupo de pacientes foi constituído por 43 indivíduos com diagnóstico confirmado de hipertensão maligna pela Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Critério de Inclusão:

- Diagnóstico de hipertensão maligna, caracterizado por hipertensão essencial com pressão arterial diastólica acima de 130 mmHg, retinopatia com papiledema, insuficiência renal, necrose fibrinóide de arteríolas renais e curso clínico rapidamente progressivo.³⁷

Critérios de Exclusão:

- Desconhecimento quanto à procedência.
- Desconhecimento das características antropomórficas de seu pai, mãe e avós paternos e maternos.
- Não comparecimento para coleta de amostra de sangue.
- Falta de acesso venoso.
- Tabagismo e/ou etilismo.
- Uso de medicamentos anti-inflamatórios e/ou interferon e/ou imunoglobulina no momento da entrevista/coleta de amostra de sangue.
- Quadro infeccioso nos sete dias que precederam à entrevista/coleta.
- Febre nos sete dias precedentes à entrevista/coleta de amostra de sangue.

4.2.2 Doadores de sangue

Foram utilizados como controle, 100 indivíduos considerados aptos à doação de sangue pela Divisão de Coleta da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo.

Critérios de Inclusão:

- Doadores de sangue normotensos.
- Doadores que se enquadravam no pareamento com os pacientes hipertensos malignos.

Critérios de Exclusão:

- Doadores que relataram histórico de insuficiência coronariana e de hipertensão arterial.
- Desconhecimento quanto à procedência.
- Desconhecimento das características antropomórficas de seu pai, mãe e avós paternos e maternos.

- Falta de acesso venoso.
- Tabagismo e/ou etilismo.
- Uso de medicamentos anti-inflamatórios, interferon, imunoglobulina no momento da entrevista/coleta de amostra de sangue.
- Quadro infeccioso nos sete dias que precederam à entrevista/coleta.
- Febre nos sete dias precedentes à entrevista/coleta de amostra de sangue.

4.3 Coleta e processamento do material

Os testes de fenotipagem e genotipagem Duffy e dosagem dos níveis séricos de IL-8 foram realizados no laboratório de Imuno-hematologia Clínica do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foram coletadas por punção venosa duas amostras de sangue de cada participante, uma em tubo de 5mL com anticoagulante EDTA (Ácido Etileno-diaminotetracético) e outra em tubo de 5 mL sem anticoagulante. As amostras foram coletadas por enfermeiros ou auxiliares de enfermagem, devidamente treinados e capacitados para esse procedimento.

Todas as amostras de sangue foram coletadas no período da manhã, entre 9 e 12 horas e processadas imediatamente após a coleta, evitando-se

assim eventuais diferenças nos níveis séricos de IL-8, devido a variações na concentração de interleucina-8, ao longo do dia.

As amostras foram centrifugadas a 3.400 r.p.m. em centrífuga sorológica de mesa (Sorvall RT6000D, E.U.A) por 15 minutos a 22°C. Após centrifugação, foram preparadas alíquotas para os testes e armazenadas da seguinte forma:

- 2 alíquotas de 2mL de soro para dosagem de interleucina 8 (IL-8) e armazenados em freezer à -80°C (Revco, E.U.A)
- 4 alíquotas de 200 µL de concentrado de hemácias com camada leucoplaquetária, sendo que 2 alíquotas foram encaminhadas para extração de DNA e 2 foram armazenadas em freezer à -80°C (Revco, E.U.A) para futura extração de DNA, caso necessário.
- 1 alíquota de 2 mL de concentrado de hemácias armazenado em refrigerador em temperatura entre 1°C e 6°C (Revco, E.U.A) para fenotipagem eritrocitária do sistema de grupo sanguíneo Duffy.

4.4 Fenotipagem eritrocitária do sistema de grupo sanguíneo Duffy

A fenotipagem eritrocitária dos antígenos sistema Duffy foi realizada em todas as amostras com soro anti-Fy^a e anti-Fy^b pelo método de hemaglutinação em tubo, conforme o Manual Técnico da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB).¹⁶¹ Nas amostras com resultado de Fy^b negativo, foi feito teste de adsorção, eluição para detecção do antígeno Fy^b

fraco. Para tanto, foram utilizados anti-soros comerciais anti-Fy^a e anti-Fy^b (Diamed Latino América, Brasil). A cada bateria de testes, foram utilizados controles positivos e negativos, para validar o reagente e o procedimento.

Inicialmente, a alíquota de concentrado de hemácias foi lavada 3 vezes com solução fisiológica 0,9% (JP Indústria Farmacêutica, Brasil). Em seguida, foi preparada uma suspensão de hemácias a 3% utilizando-se 30µL desse concentrado de hemácias, adicionados a um tubo de vidro 10 x 75 mm, contendo 97 µL de solução fisiológica 0,9%. Dois tubos de vidro 10 x 75 mm e limpos foram identificados como Fy^a e Fy^b. Em cada tubo foram colocados respectivamente 50 µL do soro comercial anti-Fy^a e 50 µL do soro comercial anti-Fy^b. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 50 µL de cada suspensão de hemácias a 3%.

Os tubos foram incubados à 37°C em banho-maria (Fanem, Brasil) por 30 minutos, seguido de 3 lavagens com solução fisiológica 0,9% e adição de 100 µl de soro antiglobulina monoespecífico anti-IgG (Fresenius, Hemocare, Brasil). Os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 3.400 r.p.m. por 15 segundos em uma centrífuga de mesa (Clay Adams-Serofuge, New Jersey, E.U.A). A leitura foi realizada macroscopicamente com auxílio de um aglutinoscópio (Hemoblu, Santa Catarina, Brasil), observando-se a presença ou ausência de aglutinação. Foi considerado positivo o teste onde se observou presença de aglutinação, indicando a presença do antígeno correspondente.

Nos casos de fenótipo Fy(a-b-) e Fy(a+b-), estudos de adsorção e eluição foram realizados para verificação de fenótipo Fy(a-b+^{fraco}) e Fy(a+b+^{fraco}).

A técnica de adsorção foi realizada adicionando-se 200 µL de hemácias teste previamente lavadas, com solução fisiológica, a 0,9%, a 200 µL de soro comercial anti-Fy^b em tubo de vidro 12 x 75 mm. Foi realizada incubação em banho-maria a 37°C por 60 minutos, homogeneizando periodicamente a mistura, para aumentar a eficácia da adsorção. O tubo foi centrifugado a uma velocidade de 3.400 r.p.m. por 45 segundos em uma centrífuga de mesa (Clay Adams-Serofuge, New Jersey, E.U.A). O sobrenadante foi retirado e as hemácias lavadas uma vez com solução fisiológica a 0,9% aquecida à 37°C para evitar a eluição do anticorpo adsorvido. A seguir, foi realizada a técnica de eluição, utilizando o kit de eluição ácida (Diacidell, Diamed, Cressier SurMorat, Suíça), que libera anticorpos adsorvidos às hemácias, sem destruição eritrocitária. A lavagem das hemácias adsorvidas, foi realizada 4 vezes, com solução de lavagem do kit de eluição. Após a última lavagem, o sobrenadante foi retirado completamente, separando-se parte desse sobrenadante para verificação da eficácia da lavagem, anteriormente à eluição. Foram adicionados 200 µL de solução de eluição ao tubo contendo as hemácias adsorvidas, e após homogeneização o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 3.400 r.p.m. em centrífuga de mesa. A seguir, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro limpo 12 x 75 mm e a solução tampão foi adicionada gota a gota,

homogeneizando-se até surgir uma coloração azulada, indicando que um pH neutro de 7,0 foi atingido. A seguir, o tubo foi centrifugado por 1 minuto, para remover completamente os resíduos de células. O eluato foi testado contra hemácias comerciais de fenótipo conhecido Fy(a-b+) e Fy(a+b-), utilizadas como controles positivo e negativo respectivamente. Após incubação à 37°C em banho-maria por 60 minutos, os tubos foram lavados 3 vezes com solução fisiológica 0,9% e foi adicionado 100 µL de soro antiglobulina monoespecífico anti-IgG (Fresenius, Hemocare, Brasil) em cada um. Procedeu-se à centrifugação a uma velocidade de 3.400 r.p.m. por 15 segundos em uma centrífuga de mesa. A leitura macroscópica foi realizada com auxílio de um aglutinoscópio (Hemoblu, Santa Catarina, Brasil), observando a presença ou ausência de aglutinação. Os resultados foram anotados em formulário específico. (Apêndice 3)

4.5 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído em duplicata utilizando kit de extração de DNA genômico do sangue (QIAamp DNA Mini Kit , Qiagen, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Conforme as instruções do fabricante, em um microtubo de polipropileno (Eppendorf, Alemanha), foram adicionados 20 µL de proteinase K (protease Qiagen, Alemanha), 200 µL da amostra e 200 µL de

solução tampão de lise. O tubo foi homogeneizado por 15 segundos em um homogeneizador (Vortex Genie 2, Scientific Industries, E.U.A). Foi incubado em um termobloco a 56°C por 10 minutos e homogeneizado novamente por 15 segundos. Para remover gotículas da tampa, o tubo foi centrifugado por 15 segundos a 5.000 r.p.m. em uma centrífuga de microtubos (Biofuge Haemo, Heraeus Instruments, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto, seguido de homogeneização e centrifugação por 15 segundos a 5.000 r.p.m. O material foi transferido para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor e centrifugado a 8.000 r.p.m. por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e substituído por outro igual. Foram adicionados 500 µL de solução tampão de lavagem 1, seguido incubação a 22°C por 1 minuto e centrifugação a 8.000 r.p.m. por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado e substituído por um novo. Foram adicionados 500 µL solução tampão de lavagem 2, seguido de incubação a 22°C por 1 minuto e centrifugação a 13.000 r.p.m. por 4 minutos. O tubo coletor foi descartado e substituído por um microtubo de polipropileno com tampa. Para finalizar, adicionou-se 100 µL de tampão de eluição, permanecendo a amostra a 22°C por 5 minutos. As colunas contendo a amostra foram centrifugadas a 8.000 r.p.m. por 1 minuto, para que o DNA fosse eluído para o tubo plástico com tampa. O microtubo de polipropileno contendo o DNA genômico extraído, foi armazenado a 4°C em refrigerador (Revco, E.U.A), para posterior quantificação de DNA. A outra alíquota foi armazenada em freezer -20°C (Revco, E.U.A).

4.6 Quantificação de DNA

A quantificação de DNA extraído das amostras, foi realizada por comparação com o padrão de Lambda-DNA. Foi inicialmente preparada uma solução de agarose a 1% à qual foi adicionada solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL. A seguir, essa solução foi colocada em uma cuba de eletroforese para a solidificação do gel. As amostras de DNA a serem quantificadas foram aquecidas em um termobloco a 60°C por 15 minutos, para a solubilização completa do DNA. Foi transferido 1 µL de cada amostra a um microtubo, acrescentados 1 µL de solução tampão de aplicação de DNA “loading buffer” e 8 µL de água processada em equipamento de purificação (Milli Q Millipore, E.U.A), e realizada a homogeneização. Em cada poço do gel foram aplicados 10 µL de cada uma das diluições de Lambda-DNA (500, 250, 125 e 62,5 ng/µL), (Invitrogen, Brasil), nas quatro primeiras posições do gel e nos poços seguintes as amostras de DNA previamente preparadas. Os segmentos foram separados por eletroforese durante 15 minutos sob uma voltagem de 100V. A visualização foi realizada e documentada em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye, Stratagene, E.U.A). O cálculo da quantidade aproximada de DNA de cada amostra foi feito, comparando-a com as bandas apresentadas pelos padrões de Lambda-DNA.

Figura 2: Fotografia do gel de agarose demonstrando a quantificação do DNA genômico de 4 amostras utilizadas no estudo. Os números 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente Lambda-DNA 500, 250, 125 e 62,5 ng/μL; a coluna 5 e 6 representam amostras com 100 ng/μL de DNA; a coluna 7 e 8 representam amostras com 300 ng/μL de DNA.

4.7 Genotipagem *DUFFY*

Para amplificação das regiões do gene *DUFFY* no cromossomo 1 na posição 1q22-q23 do braço longo, foi realizada técnica de reação em cadeia da polimerase de acordo com os princípios descritos por Saiki *et al.*^{162, 163}

Figura 3: Representação esquemática da região flanqueada pelos iniciadores onde estão localizados os exons 1, 2 e região promotora GATA-box do gene *DUFFY*.

Foi utilizado o método de PCR-RFLP para a determinação do genótipo *DUFFY*. A análise dos polimorfismos das regiões 125, 145, 265 e 298 do exon 2 que caracterizam os alelos *FYA*, *FYB* e *FYX* e da região promotora -33 do gene *DUFFY* que caracteriza o alelo *FYB*-33 foi realizada pela amplificação do DNA por meio de reações de PCR, seguida de digestão enzimática.

Figura 4: Representação esquemática da região flanqueada pelos iniciadores onde estão localizados os exons 1, 2 e região promotora GATA-box do gene *DUFFY* e os polimorfismos.

Os iniciadores (Operon Biotechnologies GmbH, Colonia, Alemanha) que foram desenhados de forma a flanquear essas regiões, foram descritos por Marion Reid ⁶⁰ e estão relacionados no quadro 2. Para o estudo do exon 2 do gene *DUFFY*, usamos o par de iniciadores FYAB1 - senso e FYAB2 - antisenso, com a obtenção de um fragmento de DNA de 392 pares de base. Para o estudo do polimorfismo -33T>C da região promotora do gene *DUFFY*, usamos os iniciadores FYN1 – senso e FYN2 – antisenso, com a obtenção de fragmento de DNA de 189 pares de base.

Quadro 2: Seqüência de iniciadores utilizados para amplificação da região promotora e exon 1 e para o exon 2 do gene *DUFFY*.

Nome do iniciador	Exon	Seqüência de nucleotídeos	Produto
FYN1 - senso	1 (5'3')	5'-CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA-3'	189 pb
FYN2 - antisenso	1 (3'5')	3'-CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG-5'	
FYAB1 - senso	2 (5'3')	5'-TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC-3'	392 pb
FYAB2 - antisenso	2 (3'5')	5'-AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC-3'	

As reações de PCR foram realizadas a um volume final de 60 µL contendo 150ng do DNA genômico, 3µL de MgCl₂ 50 mM, 3,0µL da mistura de dNTP 10 mM, 0,3 µL de 5U de Taq polimerase (Platinum, Invitrogen, Brasil) e 5,0µL dos iniciadores senso e antisenso (10 mM). A reação foi realizada em

termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e o segmento foi amplificado a uma temperatura inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de desnaturação por 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores a 62°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos.

A análise do produto de amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL, Invitrogen, E.U.A), sob uma voltagem de 100V. A visualização foi realizada e documentada em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye, E.U.A).

Figura 5: Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado da amplificação, compreendendo a região promotora GATA-box e o exon 1 do gene *DUFFY*, obtendo um fragmento de 189 pares de base.

Figura 6: Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado da amplificação, compreendendo o exon 2 do gene *DUFFY*, obtendo um fragmento de 392 pares de base.

4.7.1 Digestão enzimática *StyI*

Após a amplificação do fragmento da região promotora e exon I do gene *DUFFY*, utilizou-se a enzima de restrição *StyI* (New England BIOLABSInc, E.U.A) que reconhece sítios específicos para o polimorfismo -33T>C, que caracterizam o alelo *FYB-33* (Figura 7).

Figura 7: Representação esquemática do sítio de corte da enzima Styl na região promotora GATA-box.

A reação da digestão com a enzima Styl, foi realizada com 10 µL do produto amplificado de 189 pares de base, e uma mistura contendo 3 µL do tampão de reação (10XNEBuffer 3), 0,3 µL da solução de 200 µg de soro fetal bovino, 0,5 µL (4 U) de BanI e 16,2 µL de H₂O, perfazendo um volume final de 30 µL. Após incubação a 37°C por 16 horas para o processo de digestão, realizou-se uma incubação a 65°C por 20 minutos para a inativação da enzima.

A análise do produto digerido foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 3,0%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL, Invitrogen, E.U.A), sob uma voltagem de 100V. A visualização foi realizada e documentada em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye, Stratagene, E.U.A).

O produto digerido gerou fragmentos de 108, 61 e 20 pares de base para região GATA mutado e fragmentos de 108 e 81 para região GATA não mutado.

Figura 8: Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima Styl.

4.7.2 Digestão enzimática *BanI*

A enzima *BanI* (New England, BIOLABS, E.U.A) que reconhece sítios específicos para o polimorfismo 125 G>A, do exon 2 do gene *DUFFY*, que caracterizam o alelo *FYA* e o alelo *FYB*. (Figura 3)

Figura 9: Representação esquemática do sítio de corte da enzima *BanI* no exon 2.

A reação da digestão com a enzima *BanI*, foi realizada com 10 µL do produto amplificado de 392 pb, e uma mistura contendo 3 µL do tampão de reação (10XNEBuffer 4), 0,5 µL (4 U) de *BanI* e 16,5 µL de H₂O, perfazendo um volume final de 30 µL. Após incubação a 37°C por 16 horas para o processo de

digestão, realizou-se uma incubação a 65°C por 20 minutos para a inativação da enzima.

A análise do produto digerido foi realizada com o uso de eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL, Invitrogen, E.U.A), sob uma voltagem de 100V. A visualização foi realizada e documentada em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye, Stratagene, E.U.A).

O produto digerido gerou fragmentos de 210, 96 e 86 pares de base que caracterizam o alelo *FYA* e fragmentos de 306 e 86 pares de base que caracterizam o alelo *FYB*. (Figura 10)

Figura 10: Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima *BanI* que caracteriza os alelos *FYA* e *FYB*.

4.7.3 Digestão enzimática Mspa1I

A enzima Mspa1I que reconhece sítios específicos para a região 265 C>T, do exon 2 do gene *DUFFY*, que caracterizam o alelo *FYX* e a região 145 G>T do exon 2 do gene *DUFFY*.¹⁶

Figura11: Representação esquemática do sítio de corte da enzima Mspa1I no exon 2.

A reação da digestão com a enzima MspA1I, foi realizada com 10 µL do produto amplificado de 392 pb, e uma mistura contendo 3 µL do tampão de reação (10XNEBuffer 4), 0,3 µL da solução de 200 µg de albumina de soro bovino, 0,5 µL (5 U) de MspA1I e 16,2 µL de H₂O, perfazendo um volume final

de 30 μ L. Após incubação a 37°C por 16 horas para o processo de digestão, realizou-se uma incubação a 65°C por 20 minutos para a inativação da enzima. A análise do produto digerido foi realizada com o uso de eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL, Invitrogen, E.U.A), utilizando-se marcador de 25 pares de base, sob uma voltagem de 100V. A visualização foi realizada e documentada em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye, Stratagene, E.U.A).

O produto digerido gera fragmentos de 161, 119, 85 e 27 pares de base que caracterizam o alelo *FYX* e a região 145G>T do exon 2 do gene *DUFFY*, que gera um padrão alterado de bandas, os fragmentos de banda 124, 119, 85, 37, 27 caracterizam o alelo *FYB*.

Figura 12: Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima MspA1I que caracteriza os alelos *FYX*.

4.7.4 Digestão enzimática MwoI

A enzima MwoI que reconhece sítios específicos para a região 298 G>A, do exon 2 do gene *DUFFY*, que caracteriza o alelo *FYX* e podem aparecer independentemente. (Figura 13).

Figura 13: Representação esquemática do sítio de corte da enzima MwoI no exon 2.

A reação da digestão com a enzima MwoI, foi realizada com 10 μ L do produto amplificado de 392 pb, e uma mistura contendo 3 μ L do tampão de reação (10XNEBuffer 3), 0,5 μ L (5 U) de MwoI e 16,5 μ L de H₂O, perfazendo um volume final de 30 μ L. Após incubação a 60°C por 16 horas para o processo

de digestão, realizou-se uma incubação a 65°C por 20 minutos para a inativação da enzima.

A análise do produto digerido foi realizada com o uso de eletroforese em gel de agarose a 3,0%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL, Invitrogen, E.U.A), utilizando-se marcador de 100 pares de base (Invitrogen – Brasil), sob uma voltagem de 100V. A visualização foi realizada e documentada em sistema de fotodocumentação (Eagle-eye, E.U.A).

O produto digerido gerou fragmentos de 341 e 51 pares de base que caracteriza o alelo mutado 298A e fragmentos de 274, 67 e 51 pares de base que caracteriza o alelo consenso 298G.

Figura 14: Fotografia do gel de agarose demonstrando o resultado do produto digerido da enzima MwoI que caracteriza os alelos *FYX*.

4.8 Dosagem de interleucina-8

A dosagem de interleucina-8 foi realizada pelo método ELISA de captura (RayBiotec, E.U.A) proporcionando um ensaio quantitativo de dosagem de interleucina-8.

Foram utilizadas microplacas de acrílico revestidas com anticorpos monoclonais contra interleucina-8 e com todos os reagentes em temperatura ambiente foi inicialmente preparado uma curva padrão. A amostra controle de interleucina-8 fornecida pelo kit apresentava concentração inicial de 50 ng/mL. A curva padrão foi preparada por diluição seriada, sendo o ponto mais concentrado estabelecido em 400 pg/mL, os pontos seguintes foram de 160 pg/mL, 64 pg/mL, 25,6 pg/mL, 10,24 pg/mL, 4,10 pg/mL, 1,64 pg/mL e 0 pg/mL.

Nas microplacas revestidas com anticorpos monoclonais contra interleucina-8 foi adicionado 100 µL de cada amostra e padrões em duplicata e incubados em temperatura ambiente por 2 horas e 30 minutos. A interleucina-8 presente nas amostras liga-se as microplacas pelos anticorpos imobilizados. A seguir as microplacas são lavadas em lavadora automática de microplacas (Organon Teknika, E.U.A) por 4 vezes e adicionado 100 µL de anti-interleucina-8 biotilado incubando-se por mais 1 hora em temperatura ambiente. Após a

lavagem por 4 vezes em lavadora automática foi adicionado 100 µL de solução de estreptavidina e incubado por 45 minutos em temperatura ambiente.

As microplacas foram novamente lavadas em lavadora automática por 5 vezes e adicionado 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) desenvolvendo coloração com maior intensidade em proporção à quantidade de interleucina-8 ligada e, após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 50 µL de solução de parada de reação (ácido sulfúrico 2 molar), mudando de cor de amarelo para azul.

A leitura foi realizada em leitor automático de microplacas (Organon Teknika, E.U.A) em absorbância de 450nm.

4.9 Análise estatística

Variáveis estudadas

- Fenótipo Duffy
- Genótipo *DUFFY*
- Sexo
- Raça
- Idade
- Presença dos alelos *DUFFY*
- Valor de IL-8

As variáveis fenótipo, genótipo, presença dos alelos *DUFFY*, sexo e raça foram tratadas como categóricas, e as variáveis valor de IL-8 e idade como variáveis contínuas. Os testes do qui-quadrado ou exato de Fisher foram usados para a comparação de frequência de variáveis categóricas, e as variáveis contínuas foram comparadas por Mann-Whitney, de acordo com as distribuições das variáveis, sendo considerado significativo $p < 0,05$ e altamente significativo $p < 0,01$.

O estudo da associação entre a hipertensão maligna e cada uma das variáveis, foi feito por estimativa por *odds ratio* (OR), além da estatística qui-quadrado.

A etapa seguinte consistiu em selecionar as variáveis que obtiveram nível de significância do teste menor do que 0,20 ($p < 0,20$), para serem utilizadas em um modelo de regressão logística e um modelo linear generalizado ajustado.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATA 8.0 (StataCorp, College Station, TX).

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos grupos estudados

O grupo de estudo composto de 43 pacientes com hipertensão maligna, não aparentados, foi pareado com o grupo controle, composto de 100 indivíduos doadores de sangue, não aparentados, em relação a sexo, idade e raça conforme tabelas 1 e 2.

A distribuição dos indivíduos desse estudo de acordo com sexo, raça e idade foi proposta ser pareado de acordo com o obtido do grupo de pacientes, portanto foi coletado primeiramente amostras de sangue de todos os pacientes com hipertensão maligna. (tabela 1)

Após o termino da coleta das amostras dos pacientes iniciou-se a coleta das amostras de sangue do grupo controle baseado numa proporção para esse pareamento. (tabela 2)

Tabela 1: Distribuição dos pacientes com hipertensão maligna de acordo com sexo, idade e raça.

Sexo	Raça	Idade					TOTAL
		25-35	36-45	46-55	56-65	66-75	n(%)
Masc	Branco	0	2	2	2	2	8(18,6%)
	Negro	1	3	4	4	0	12(27,9%)
	Mulato	0	0	1	0	0	1(2,3%)
Sub-total							21(48,8%)
Fem	Branca	1	1	0	2	2	6(14%)
	Negra	1	2	3	1	0	7(16,3%)
	Mulata	1	1	6	1	0	9(20,9%)
Sub-total							22(51,2%)
TOTAL							43(100%)

Tabela 2: Distribuição dos doadores de sangue de acordo com raça, sexo e idade.

Sexo	Raça	Idade					TOTAL
		25-35	36-45	46-55	56-65	66-75	
Masc	Branco	0	5	4	10	0	19 (19%)
	Negro	2	7	10	9	0	28 (28%)
	Mulato	0	0	3	0	0	3 (3%)
Sub-total							50 (50%)
Fem	Branca	2	2	0	10	0	14 (14%)
	Negra	3	4	7	2	0	16 (16%)
	Mulata	3	2	13	2	0	20 (20%)
Sub-total							50 (50%)
TOTAL							100 (100%)

Tabela 3: Estudo do pareamento entre o grupo de pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue) estratificado por raça, sexo e idade.

		OR (IC)	p
Raça	Branco	0,98 (0,45-2,09)	0,8867
	Mulato	1,01 (0,43-2,36)	0,8547
	Negro	1,00 (0,49-2,06)	0,8704
Sexo	Masculino	0,95 (0,46-1,95)	0,9563
	Feminino	1,04 (0,51-2,14)	0,9563
Idade	> 41 anos	0,95 (0,41-2,23)	0,9058
	41 – 55 anos	0,82 (0,40-1,68)	0,7293
	< 55 anos	1,30 (0,60-2,83)	0,6367

Analisando a tabela 3, o resultado do pareamento entre raça, sexo e idade, para esse estudo caso controle, com pacientes com hipertensão maligna e doadores de sangue, mostrou uma correta distribuição de indivíduos quanto aos fatores sexo, idade e raça. Não observando diferença estatisticamente significativa para esses fatores com $p > 0,05$.

Isso definido pode-se dessa forma avaliar os questionamentos entre fenótipos, genótipos e alelos do sistema de grupo sanguíneo Duffy na associação com hipertensão maligna como proposto.

5.2 Frequência fenotípica, genotípica e alélica do sistema de grupo sanguíneo Duffy

Os resultados da fenotipagem do sistema de grupo sanguíneo Duffy obtidos estão representados na tabela 4.

Após realização das técnicas de adsorção e eluição com soro anti-Fy^b não foi observada baixa expressão do antígeno Fy^b nos pacientes com hipertensão maligna, caracterizado pelos fenótipos Fy(a-b+^{fraco}), Fy(a+b+^{fraco}). No grupo controle, um doador de sangue foi caracterizado como Fy(a-b+^{fraco}) e dois doadores de sangue como Fy(a+b+^{fraco}).

Tabela 4: Distribuição dos fenótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).

Fenótipo Duffy		Pacientes com hipertensão maligna	Doadores de sangue	p
Fy(a+b+)	n (%)	10 (23,26)	30 (30)	0,3439
Fy(a-b+)	n (%)	15 (34,88)	37 (37)	0,3439
Fy(a+b-)	n (%)	12 (27,91)	20 (20)	0,2249
Fy(a-b-)	n (%)	6 (13,95)	10 (10)	0,3533
Fy(a-b+ ^{fraco})	n (%)	0	1 (1)	0,6944
Fy(a+b+ ^{fraco})	n (%)	0	2 (2)	0,4808
TOTAL		43	100	

O fenótipo mais freqüente encontrado foi o Fy(a-b+) com 34,88% em pacientes com hipertensão maligna e 37% em doadores de sangue. O fenótipo Fy(a-b-) teve prevalência de n=6 (13,95%) entre pacientes com hipertensão maligna e n=10 (10%) em doadores de sangue. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Tabela 5: Distribuição dos genótipos do sistema de grupo sanguíneo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).

<i>Genótipo DUFFY</i>		Pacientes com hipertensão maligna	Doadores de sangue	p
<i>FYA/FYA</i>	n (%)	4 (9,30)	12 (12,00)	0,4231
<i>FYA/FYB</i>	n (%)	10 (23,20)	30 (30,00)	0,4295
<i>FYA/FYB-33</i>	n (%)	8 (18,70)	8 (8,00)	0,0697
<i>FYB/FYB</i>	n (%)	5 (11,60)	20 (20,00)	0,5603
<i>FYB/FYB-33</i>	n (%)	10 (23,20)	17 (17,00)	0,0575
<i>FYB-33/FYB-33</i>	n (%)	6 (14,00)	10 (10,00)	0,0224
<i>FYA/FYX</i>	n (%)	-	2 (2,00)	0,4808
<i>FYB/FYX</i>	n (%)	-	1 (1,00)	0,6765
TOTAL		43	100	

Os genótipos mais comuns no grupo de pacientes com hipertensão maligna foram *FYA/FYB* e *FYB/FYB-33*, ambos com 23,2%, no grupo controle o genótipo mais freqüente foi *FYA/FYB* com 30%. Observa-se o genótipo *FYB-33/FYB-33* com diferença estatisticamente significativa de $p=0,0224$.

Nesse estudo não encontramos a presença da mutação 145G>T.

Tabela 6: Distribuição dos alelos do sistema de grupo sanguíneo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).

<i>Alelo DUFFY</i>		Pacientes com hipertensão maligna	Doadores de sangue	p
<i>FYA</i>	n (%)	26 (30,23)	64 (32,00)	0,4691
<i>FYB</i>	n (%)	30 (34,88)	88 (44,00)	0,0827
<i>FYB-33</i>	n (%)	30 (34,88)	45 (22,50)	0,0191
<i>FYX</i>	n (%)	0 0	3 (1,50)	0,6122
TOTAL		43	100	

Os alelos mais comuns no grupo de pacientes com hipertensão maligna foram *FYB* e *FYB-33*, ambos com 34,88% e no grupo de doadores de sangue o alelo mais freqüente foi *FYB* com 44%. O alelo *FYB-33* mostrou-se com diferença estatisticamente significativa quando comparado os dois grupos ($p=0,0191$).

5.3 Interleucina-8

Tabela 7: Estatísticas descritivas do nível de interleucina-8 em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).

	Níveis de IL-8 em pacientes com hipertensão maligna	Níveis de IL-8 em doadores de sangue
Mínimo	3,00	2,10
1º Quartil	6,90	4,07
Mediana	9,60	6,50
Média	11,09	6,80
3º Quartil	13,65	9,60
Variância	39,50	8,73
Desvio-Padrão	6,28	2,96
Máximo	34,10	11,70

Pela tabela 7 podemos ver que o grupo de pacientes com hipertensão maligna, apresenta níveis de interleucina-8 maiores se comparado com o grupo controle.

Tabela 8: Estudo comparativo dos níveis séricos de IL-8, segundo o fenótipo Duffy em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).

Grupo	Fenótipo	min	mediana	Média (dp)	max
Pacientes com hipertensão maligna	Fy(a+b-)	3,80	8,35	9,86 (5,09)	21,30
	Fy(a+b+)	3,00	8,85	8,13 (3,02)	12,50
	Fy(a-b-)	11,40	19,29	20,98 (7,82)	34,10
	Fy(a-b+)	3,60	8,80	10,07 (4,44)	19,20
Doadores de sangue	Fy(a+b-)	2,30	6,20	6,51 (2,83)	11,10
	Fy(a+b+)	2,50	7,50	7,16 (3,11)	11,70
	Fy(a-b-)	3,10	7,85	7,36 (3,25)	11,40
	Fy(a-b+)	2,10	6,50	6,83 (2,76)	11,30
	Fy(a-b+w)	3,80	3,80	3,80	3,80
	Fy(a+b+w)	2,20	2,25	2,25 (0,07)	2,30

Tabela 9: Estudo comparativo dos níveis séricos de IL-8, segundo o genótipo *DUFFY* em pacientes com hipertensão maligna e no grupo controle (doadores de sangue).

Grupo	Genótipo	min	mediana	Média (dp)	máx
Pacientes com hipertensão maligna	<i>FYA/FYA</i>	3,80	5,90	6,80 (3,62)	11,60
	<i>FYA/FYB</i>	3,00	8,85	8,13 (3,02)	12,50
	<i>FYA/FYB-33</i>	6,50	9,00	11,40 (5,20)	21,30
	<i>FYB/FYB</i>	3,60	7,20	7,60 (3,09)	12,00
	<i>FYB/FYB-33</i>	5,30	11,30	11,31 (4,62)	19,20
	<i>FYB-33/FYB-33</i>	11,40	19,29	20,98 (7,82)	34,10
Doadores de sangue	<i>FYA/FYA</i>	2,30	6,05	6,36 (3,09)	11,10
	<i>FYA/FYB</i>	2,50	7,50	7,16 (3,11)	11,70
	<i>FYA/FYB-33</i>	4,10	6,20	6,73 (2,59)	10,80
	<i>FYB/FYB</i>	2,10	7,85	7,20 (2,65)	10,90
	<i>FYB/FYB-33</i>	3,00	5,70	6,39 (2,90)	11,30
	<i>FYB-33/FYB-33</i>	3,10	7,85	7,36 (3,25)	11,40
	<i>FYA/FYX</i>	2,20	2,25	2,25 (0,07)	2,30
	<i>FYB/FYX</i>	3,80	3,80	3,80	3,80

Para verificar a associação entre as variáveis estudadas e hipertensão maligna inicialmente foi feita uma análise univariada onde se obtiveram os valores de Odds Ratio (OR) para cada uma das variáveis em estudo por meio de regressão logística univariada. Os resultados dessas análises são apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Associação entre hipertensão maligna e as variáveis estudadas.

		OR (IC)	p
Fenótipo	Fy(a-b-)	1,41 (0,47-4,16)	0,7359
	Fy(a-b+)	0,86 (0,41-1,83)	0,8581
	Fy(a+b-)	1,49 (0,65-3,41)	0,4659
	Fy(a+b+)	0,67 (0,29-1,54)	0,4689
Genótipo	<i>FYA/FYA</i>	0,72 (0,22-2,39)	0,8114
	<i>FYA/FYB</i>	0,67 (0,29-1,54)	0,4689
	<i>FYA/FYB-33</i>	2,54 (0,88-7,30)	0,1365
	<i>FYB/FYB</i>	0,50 (0,17-1,45)	0,2973
	<i>FYB/FYB-33</i>	1,42 (0,59-3,43)	0,5751
	<i>FYB-33/FYB-33</i>	1,41 (0,47-4,16)	0,7359
Alelo	<i>FYA</i>	0,92 (0,53-1,59)	0,8758
	<i>FYB</i>	0,68 (0,40-1,15)	0,1919
	<i>FYB-33</i>	1,84 (1,06-3,21)	0,0416
Dosagem de IL-8	Interleucina-8	1,28 (1,14-1,44)	<0,001

Aplicando-se os testes de comparação, observou-se que a variável IL-8 apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p < 0,001$) e que o alelo *FYB*-33 também mostrou uma relação significativa com a hipertensão maligna ($p = 0,0416$).

Analisando a tabela 10, notamos que não há associação entre o fenótipo e o genótipo *DUFFY* com hipertensão maligna, ou seja, fenótipo e genótipo não são fatores de risco para a hipertensão maligna, nesse estudo.

Então, foi ajustado um modelo de regressão logística multivariado das variáveis dosagens de IL-8 e genótipos *DUFFY*. Os valores de OR obtidos a partir desse modelo são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Odds ratio ajustados obtidos pelo modelo final de regressão logística.

	OR (IC)	p
IL-8	1,29 (1,14-1,46)	<0,001
<i>FYA/FYA</i>	0,05 (0,01-0,24)	0,7468
<i>FYA/FYB</i>	0,77 (0,18-3,22)	0,7308
<i>FYA/FYB-33</i>	1,96 (0,38-9,90)	0,4136
<i>FYB/FYB</i>	0,61 (0,12-2,96)	0,5447
<i>FYB/FYB-33</i>	1,20 (0,26-5,34)	0,8098
<i>FYB-33/FYB-33</i>	0,42 (0,06-2,80)	0,3733

Analisando a tabela 11, verificamos que somente a variável dosagem de IL-8 mostrou estar associada com a hipertensão maligna (OR=1,29; IC: 1,14:1,46, $p<0,001$).

No estudo da relação entre IL-8 e genótipos *DUFFY*, a variável resposta será IL-8 e os genótipos as variáveis independentes, o interesse está em saber os genótipos dos indivíduos se relacionam com níveis séricos de IL-8. Para isto foi ajustado um modelo linear generalizado, utilizando família Gama com função de ligação inversa, para os dados dos pacientes. Foi utilizada essa família porque os dados seguem uma distribuição Gama e não uma distribuição normal, o resultado do ajuste do modelo pode ser encontrado na tabela 12.

Tabela 12: Ajuste do modelo de linear generalizado para níveis séricos de IL-8 e genótipos *DUFFY*.

Genótipos	p
<i>FYA/FYA</i>	0,9480
<i>FYA/FYB</i>	0,4921
<i>FYA/FYB-33</i>	0,0826
<i>FYB/FYB</i>	0,6956
<i>FYB/FYB-33</i>	0,0819
<i>FYB-33/FYB-33</i>	0,0033

Analisando a tabela 12 notamos que o genótipo *FYB-33/FYB-33* é significativo a 5% ($p=0,0033$) e *FYA/FYB-33* ($p=0,0826$) e *FYB/FYB-33* ($p=0,0819$) são significantes a 10%. Portanto, podemos observar que os indivíduos que possuem o alelo *FYB-33* apresentaram associação significativa com níveis séricos de IL-8.

6 DISCUSSÃO

O Sistema de Grupo Sangüíneo Duffy foi descoberto por Cutbush *et al.* em 1950 e apresenta relevância na prática transfusional, pois seus anticorpos são clinicamente significantes em relação à transfusão sangüínea e à incompatibilidade materno-fetal.⁵

Um dos aspectos interessantes dos antígenos Duffy é sua função de receptor de merozoítas de *Plasmodium vivax*, agente responsável pela malária, e apesar da doença ser amplamente disseminada nas regiões tropicais, é praticamente ausente na África Ocidental, onde mais de 95% da população é Duffy negativa, demonstrando que a resistência ao *P. vivax* está relacionada ao fenótipo Duffy negativo.²¹ Esta questão está sendo rediscutida atualmente, pois há relatos da transmissão do *P. vivax* entre indivíduos caracterizados como antígeno Duffy negativo no Kenia e na Amazônia brasileira.^{103, 104}

Em 1994 estudos bioquímicos e estruturais da glicoproteína Duffy mostrou ser receptora de citocinas pró-inflamatórias, chamadas de quimiocinas. A partir de então, os antígenos eritrocitários Duffy foram denominados DARC (Duffy Antigen Receptor Chemokines).⁸⁸

As quimiocinas inflamatórias são proteínas cuja função primordial é direcionar as células do sistema imune, principalmente leucócitos, para os sítios de inflamação no organismo.¹³⁰

A quimiocina - interleucina-8 (IL-8) - é um dos principais ligantes do DARC eritróide e após sua introdução na circulação, é rápida e eficientemente ligada a ele, tornando-se incapaz de ativar leucócitos, de forma que o DARC eritróide pode funcionar como um “escoadouro” para a IL-8 lançada na circulação.^{25, 26}

Assim, a absorção de IL-8 nos eritrócitos pelo DARC pode funcionar como uma limitante da estimulação de leucócitos pela diminuição da IL-8 sanguínea, conseqüentemente, a ausência do DARC eritróide em indivíduos Duffy negativo reduz a capacidade de ligação da IL-8 aos eritrócitos.^{23, 24}

Na busca de correlações das funções dos antígenos Duffy, foi constatado em 2002 por Velzing-Aarts *et al.*, eventual papel do DARC como receptor de IL-8 em endotélio e essa interação poderia contribuir para a patogênese da pré-eclâmpsia.^{32, 33} Essa linha de pesquisa toma corpo com a evidência de que a pré-eclâmpsia é uma resposta inflamatória maternal excessiva na gestação.¹⁶⁴

A hipertensão é reconhecida como doença multifatorial, resultando da combinação do efeito ambiental e fatores genéticos, tendo sido demonstrado que diversos fatores podem contribuir para hipertensão, incluindo excesso de sal na dieta ou ingestão de álcool, estresse, idade, histórico familiar e genético, obesidade, bem como sedentarismo. Nos últimos anos, pesquisas sobre inflamação vascular indicam que a inflamação pode estar envolvida na iniciação

e desenvolvimento da hipertensão, levando a observar os mecanismos patogênicos da hipertensão.^{165, 166, 167, 168, 169, 170}

A hipótese da hipertensão ser uma doença inflamatória, levou-nos a propor o presente trabalho, o qual estuda a relação da fenotipagem eritrocitária e genotipagem *DUFFY* e a dosagem dos níveis séricos de IL-8 nos pacientes com hipertensão maligna comparados com doadores de sangue.

A hipertensão maligna foi escolhida como grupo de estudo porque sendo rara, as alterações genéticas mais importantes seriam ali detectadas. A escolha do grupo controle foi composta de doadores de sangue por conveniência.

Os pacientes e doadores participantes desse estudo não são tabagistas nem etilistas, pois esses fatores poderiam alterar as concentrações de IL-8 sérica.^{171, 172}

Não há relatos na literatura de interferência na dosagem de IL-8 pela administração de medicamentos de rotina nesses pacientes com hipertensão maligna, como Maleato de Enalapril, Carvedilol, Cloridrato de clonidina, besilato de amlodipina, Cloridrato de Hidralazina, Atenolol, Espironolactona, Furosemida, Cloridrato de Propranolol, Metildopa, Captopril, Sinvastatina, Alopurinol, Espironolactona, Cedur (Bezafibrato), Clibenclamida, Omeprazol, Nifedipina, Hidrocortiazida, Cloridrato de clonidina, Insulina, Metildigoxina, Ácido fólico, Complexo B, Hidroclortiazida.

Todos os pacientes com hipertensão maligna estudados nesse trabalho estavam em tratamento no momento da coleta das amostras de sangue.

Inicialmente analisamos a distribuição dos fenótipos do sistema de grupo sangüíneo Duffy entre os dois grupos e verificamos que houve predomínio do fenótipo Fy(a-b+), com 34,88% no grupo de pacientes com hipertensão maligna e 37% no grupo controle. Essa prevalência mostrou-se não significativa estatisticamente com $p=0,3439$ quando comparados os dois grupos.

Também não observamos associação entre hipertensão maligna e a variável fenótipo Fy(a-b+) em estudo estatístico de regressão logística univariada com valores de OR=0.86 com IC=0,41-1,83 e $p=0.8581$.

Com relação ao fenótipo Fy(a+b-), as prevalências encontradas para o grupo de hipertensos malignos foi de 27,91% e para o grupo controle de 20%, mostrando-se igualmente não significativa estatisticamente com $p=0,2249$ quando os dois grupos foram comparados.

Não observamos associação entre hipertensão maligna e a variável fenótipo Fy(a+b-) em estudo estatístico de regressão logística univariada com valores de OR=1.49 com IC=0,65-3,41 e $p=0.4659$.

O número de indivíduos que apresentaram o fenótipo Fy(a-b+^{fraco}) ou Fy(a+b+^{fraco}) foi nulo no grupo de pacientes com hipertensão maligna e de apenas três indivíduos no grupo controle, mostrando que a diminuição da expressão do antígeno Fy^b devido a mutação 265C>T em indivíduos com hipertensão maligna não foi estatisticamente significativa nesse estudo.

Analisando o fenótipo Fy(a+b+), observamos maior prevalência no grupo controle, com 30% dos indivíduos, e no grupo de pacientes com hipertensão maligna encontramos 23,26%, mostrando-se não significativa estatisticamente

($p=0,3439$) quando comparados os dois grupos. Esse fenótipo demonstra a não existência da mutação $-33T>C$ na região GATA-box, que abole a expressão da proteína Duffy nos eritrócitos.

Em estudo estatístico de regressão logística univariada com valores de $OR=0,67$ com $IC=0,29-1,54$ e $p=0,4689$, em que pese não termos encontrado associação entre hipertensão maligna e essa variável, observamos uma frequência maior do fenótipo $Fy(a+b+)$ no grupo controle do que no de pacientes com hipertensão maligna.

Com relação ao fenótipo $Fy(a-b-)$, que sabidamente apresenta a mutação $-33T>C$ na região GATA-box, verificamos uma maior prevalência no grupo dos pacientes com hipertensão maligna com 13,95%, e no grupo controle com 10%, entretanto, não apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos com $p=0,3533$ e isoladamente não apresenta associação entre hipertensão maligna e essa variável em estudo estatístico de regressão logística univariada com valores de $OR=1,41$ com $IC=0,47-4,16$ e $p=0,7359$.

Como demonstrado, a análise do fenótipo Duffy não tem relação estatística com a hipertensão maligna. Isoladamente, não é a melhor forma de análise, pois a fenotipagem eritrocitária não demonstra a expressão quantitativa da proteína Duffy, nem a capacidade de absorção de quimiocinas circulantes no sangue.

A análise da distribuição dos genótipos *DUFFY* entre pacientes com hipertensão maligna e doadores de sangue, apresentou o genótipo *FYA/FYB* como sendo o mais freqüente no grupo controle com 30%, sendo que entre os

pacientes com hipertensão maligna apresentou frequência de 23,20%, mostrando-se não significante estatisticamente ($p=0.4295$) quando comparados os dois grupos.

Não foi observada associação entre hipertensão maligna e a variável genótipo *FYA/FYB* em estudo de regressão univariada com valores de $OR=0,67$ com $IC=0,29-1,54$ e $p=0,4689$ e regressão multivariada com $p=0,7308$.

Os genótipos *FYA/FYA* e *FYB/FYB* da mesma forma não apresentaram associação com hipertensão maligna e níveis aumentados de IL-8 em análise univariada e multivariada.

Verificando a soma das frequências dos genótipos *FYA/FYB*, *FYA/FYA* e *FYB/FYB*, que não apresentam a mutação -33T>C na região GATA-box, encontramos 62% no grupo controle e 44,1% no grupo de pacientes com hipertensão maligna, conseqüentemente, são os genótipos mais encontrados no grupo controle.

A presença dos dois alelos *DUFFY* sugere que a glicoproteína está expressa nos eritrócitos, inclusive com satisfatória capacidade de absorção de IL-8 sérica, pois quando comparados os valores médios de IL-8 dos dois grupos de estudo, apresentam resultados próximos com um discreto aumento no grupo de pacientes com hipertensão maligna.

Com relação aos genótipos *FYB/FYB-33* e *FYA/FYB-33*, quando comparamos as frequências entre os dois grupos estudados, não encontramos diferenças estatisticamente significantes com $p=0,0575$ e $p=0,0697$, respectivamente, e isoladamente não apresentam associação com hipertensão

maligna, observados em estudo estatístico de regressão logística univariada, para o genótipo *FYB/FYB-33*, valores de $OR=1,42$ com $IC=0,59-3,43$ e $p=0,5751$ e para o genótipo *FYA/FYB-33*, valores de $OR=2,54$ com $IC=0,88-7,30$ e $p=0,1365$. No modelo de regressão multivariado também não foi observado associação.

Investigando a relação entre níveis séricos de IL-8 e os genótipos *FYB/FYB-33* e *FYA/FYB-33*, apesar de sugerirem uma associação, encontramos significância estatística de apenas 10%, com valores de $p=0,0819$ e $p=0,0826$, respectivamente.

Observando o genótipo *FYB-33/FYB-33* os indivíduos com hipertensão maligna apresentam frequência de 14%, enquanto que o grupo controle apresenta frequência de 10%, a demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,0224$), apesar de não ter sido encontrada relação estatística com a hipertensão maligna através do modelo de regressão logística univariada, todavia, encontramos associação com níveis séricos de IL-8 ($p=0,033$).

Os genótipos *FYB/FYB-33*, *FYA/FYB-33* e *FYB-33/FYB-33* apresentam a mutação $-33T>C$ na região GATA-box, nos dois primeiros genótipos em heterozigose, ou seja, apenas parte da glicoproteína Duffy está expressa nos eritrócitos, e no terceiro genótipo em homozigose, ou seja, não há expressão da glicoproteína Duffy nos eritrócitos.

Com isso, observamos que os níveis de IL-8 sérica aumentam significativamente nos pacientes com hipertensão maligna, com valores médios

de 11,31 pg/mL para o genótipo *FYB/FYB-33*, 11,41 pg/mL para o genótipo *FYA/FYB-33* e 20,98 pg/mL para o genótipo *FYB-33/FYB-33* e respectivamente para o grupo controle 6,39 pg/mL para o genótipo *FYB/FYB-33*, 6,73 pg/mL para o genótipo *FYA/FYB-33* e 7,36 pg/mL para o genótipo *FYB-33/FYB-33*.

A presença da mutação -33T>C em homozigose sugere que a glicoproteína Duffy não está expressa nos eritrócitos e indica uma insatisfatória capacidade de absorção de IL-8 sérica. Já em heterozigose, sugere que a glicoproteína Duffy está expressa parcialmente nos eritrócitos, indicando, ainda, insatisfatória capacidade de absorção de IL-8 sérica, principalmente nos pacientes com hipertensão maligna, pois quando comparados os valores médios de IL-8 com o grupo controle, apresentam resultados superiores no grupo de pacientes com hipertensão maligna com $p < 0,001$.

Não foram encontrados os genótipos *FYA/FYX* e *FYB/FYX* no grupo de pacientes com hipertensão maligna, sendo observados somente três indivíduos no grupo controle, demonstrando que a mutação 265C>T em indivíduos com hipertensão maligna não foi estatisticamente significativa nesse estudo.

Não foi observada a presença da mutação 145G>T nesse estudo.

A análise dos alelos *DUFFY* foi realizada por comparação das frequências através de testes de qui-quadrado e análise univariada para a variável resposta hipertensão maligna, portanto, não entrando na análise de regressão multivariada, por não inferirmos valores de níveis séricos de IL-8 à razão dos alelos.

Nessa pesquisa não houve a presença do alelo *FYX* no grupo de pacientes com hipertensão maligna, o que o torna não significativo nessa análise.

O alelo *FYA* mostrou-se distribuído homogeneamente em ambos os grupos, tanto de pacientes com hipertensão maligna, como de doadores de sangue, não apresentando diferença estatisticamente significativa $p=0,4691$. Na avaliação univariada também não encontramos associação com hipertensão maligna com $OR=0,92$ $IC=0,53-1,59$ e $p=0,8758$.

Em relação ao alelo *FYB*, não encontramos diferença estatisticamente significativa $p=0,0827$ quando comparamos os dois grupos de estudo. Da mesma forma, não foi verificada associação com hipertensão maligna na análise univariada com $OR=0,68$ $IC=0,40-1,15$ e $p=0,1919$.

Na análise do alelo *FYB-33*, observamos uma frequência em pacientes com hipertensão maligna de 34,88% e em doadores de sangue de 22,50%, diferença esta estatisticamente significativa ($p=0,0191$) entre os dois grupos. Na análise univariada houve associação estatisticamente significativa entre o alelo *FYB-33* e a hipertensão maligna com $OR=1,84$ $IC=1,06-3,21$ e $p=0,0416$.

Finalmente, nos dados dos níveis séricos de IL-8, encontramos associação altamente significativa à hipertensão maligna, $p<0,001$, tanto na análise univariada quanto na análise multivariada.

Não detectamos associação nesse trabalho, entre raça e hipertensão maligna. Por análise de regressão logística univariada encontramos valores não

significantes estatisticamente para brancos com $p=0,8867$, mulatos com $p=0,8547$ e para negros com $p=0,8704$.

Não observamos relação estatística nesse estudo, entre a variável sexo e hipertensão maligna; para o sexo masculino, encontramos $p=0,9563$ e para o sexo feminino $p=0,9563$.

Igualmente, não encontramos associação entre a hipertensão maligna e a variável idade. Em ambos os grupos, para indivíduos com idade inferior a 41 anos, observou-se valores de $p=0,9058$; com idade entre 41 e 55 anos, valores de $p=0,7293$ e com idade igual ou superior a 56 anos, $p=0,6367$.

Em nosso estudo, pudemos verificar níveis de IL-8 em plasma de pacientes com hipertensão maligna elevados, quando comparados com doadores de sangue.

Em artigos publicados em 2002 por Velzing-Aarts *et al.*, os quais mostraram as primeiras correlações entre a pré-eclampsia e os fenótipos Duffy negativos com o aumento dos níveis séricos de IL-8, respaldaram o presente estudo.^{32, 33}

Em outro estudo, Sharma *et al.*, não só foi observado que o aumento era significativo, como foi sugerido que a IL-8 fosse utilizada como marcador de pró-inflamação/anti-inflamação e disfunção endotelial em gestantes com pré-eclâmpsia.¹⁷³

Os valores aumentados de IL-8 podem significar aumento ou redução da capacidade de absorção dessa quimiocina. Nesse trabalho, indivíduos homozigotos *FYB-33/FYB-33* apresentaram níveis séricos de IL-8

significativamente maiores que os indivíduos heterozigotos para a mutação *FYB-33* e maiores ainda que indivíduos que não apresentam a mutação.

Nesse estudo apresentamos dados da forte associação da quimiocina IL-8 e o genótipo *DUFFY*, sendo que alguns autores relataram associações de marcadores inflamatórios e doenças coronarianas, corroborando com nossos achados.

Boekholdt *et al.*, em um estudo realizado em 2004 com 30.466 indivíduos, observaram que níveis aumentados de concentração plasmática de IL-8 estão associados com o aumento do risco futuro de doença arterial coronariana entre homens e mulheres saudáveis. Os dados prospectivos desse trabalho suportam o papel da IL-8 no desenvolvimento de eventos da doença arterial coronariana.³⁰

A arteriosclerose é uma doença inflamatória crônica que representa uma das causas primárias da doença coronariana e infarto do miocárdio.¹⁷⁴ O recrutamento de células inflamatórias é o passo essencial no desenvolvimento e progressão da doença vascular aterosclerótica.^{175, 176}

Mais evidências demonstram o importante papel dos marcadores inflamatórios, como relatado no artigo de 2003 de Abbate *et al.*, o qual mostra que níveis séricos de proteína C-reativa podem ser utilizados como marcadores de risco para possível infarto do miocárdio na síndrome coronariana aguda.¹⁷⁷

Foi visto ainda, que quando do infarto agudo do miocárdio, há significativo aumento dos níveis de quimiocinas, de onde conclui-se que este aumento tem papel dominante na resposta inflamatória cardíaca.¹⁷⁸

Por meio da análise estatística verificamos que a hipertensão maligna possui forte associação com níveis séricos de IL-8 (por meio do modelo de regressão logística multivariado) e com o alelo *FYB-33* (cálculo do OR). Os níveis séricos de IL-8, por sua vez, mostraram associação significativa com os genótipos que continham o alelo *FYB-33*, corroborando com a hipótese da hipertensão ser uma doença inflamatória.

Outros estudos são necessários, como análises qualitativas (RT-PCR) e quantitativas (Q-PCR) do gene e da proteína Duffy, para se apontar uma correlação mais precisa dessa doença. Da mesma forma faz-se necessário investigar essa relação com outros grupos de hipertensos.

Esse estudo demonstrou pela primeira vez a associação entre a hipertensão maligna e a expressão do alelo mutado *FYB-33*, além de níveis aumentados de IL-8 séricas.

7 CONCLUSÕES

1 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos fenótipos Duffy dos pacientes com hipertensão maligna e as frequências dos fenótipos Duffy dos doadores de sangue, mostrando que não há correlação entre os fenótipos Duffy e hipertensão maligna.

2 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos genótipos *DUFFY* dos pacientes com hipertensão maligna e as frequências dos genótipos *DUFFY* dos doadores de sangue, mostrando que não há correlação entre os genótipos *DUFFY* e hipertensão maligna.

3 – Encontramos diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos alelos *DUFFY* dos pacientes com hipertensão maligna e as frequências dos alelos *DUFFY* dos doadores de sangue, mostrando que há correlação entre o alelo *FYB-33* e hipertensão maligna ($p=0,0416$).

4 - Conseguimos demonstrar uma correlação entre níveis elevados de IL-8 em pacientes com hipertensão maligna e genótipo *FYB-33/FYB-33* ($p=0,003$).

5 - Também observamos níveis elevados de IL-8 nos pacientes com hipertensão maligna quando comparados com o grupo controle (doadores de sangue), $p<0,001$.

6 -Nossos resultados suportam a hipótese de que há uma correlação entre presença do alelo mutado *FYB-33* e aumento dos níveis de IL-8 em pacientes com hipertensão maligna, indicando que a IL-8 tem um papel potencial na fisiopatologia da hipertensão maligna por apresentar um efeito regulatório inibitório em pacientes que apresentam em seu genótipo o alelo *FYB-33*.

REFERÊNCIAS

-
- ¹ Landsteiner K. Individual differences in human blood. *Science* 1931; 73: 405.
- ² Levine P, Burnham L, Katzin EM, Vogel P. Role of iso-immunization in pathogenesis of erythroblastosis fetalis. *AM J Obstet Gynecol.* 1941; 42:925.
- ³ Storry JR, Olsson ML. Genetic basis of blood group diversity. *Br J Haematol.* 2004;126:759-71.
- ⁴ Available ISBT Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens. Terminology:<http://ibgri.blood.co.uk/ISBT%20Pages/ISBT%20Terminology%20Pages/ Table%20of%20blood%20group%20systems.htm> cited on 2008/05/09.
- ⁵ Cutbush M, Mollison PL, Parkin DM. A new human blood group. *Nature.* 1950;165:188-9.
- ⁶ Ikin EW, Mourant AE, Pettenkoffer HJ, Blumenthal G. Discovery of the excepted haemagglutinin anti-Fy^b. *Nature.* 1951;168:1077.
- ⁷ Cutbush M, Mollison PL. The Duffy blood group system. *Heredity.* 1950;4:383-9.

⁸ Sanger R, Race RR, JACK J. The Duffy blood groups of New York negroes: the phenotype Fy (a-b-). *Br J Haematol*. 1955;1:370-4.

⁹ Chaudhuri A, Zbrzezna V, Johnson C, Nichols M, Rubinstein P, Marsh WL, Pogo AO. Purification and characterization of an erythrocyte membrane protein complex carrying Duffy blood group antigenicity. Possible receptor for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* malaria parasite. *J Biol Chem* 1989 15;264:13770-4.

¹⁰ Mathew S, Chaudhuri A, Murty VV, Pogo AO. Confirmation of Duffy blood group antigen locus (FY) at 1q22-->q23 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1994;67:8.

¹¹ Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood*. 1996 1;87:378-85.

¹² Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood* 1995;85:615-21.

¹³ Iwamoto S, Omi T, Kajii E, Ikemoto S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44-amino acid residue. *Blood* 1995 1;85:622-6.

¹⁴ Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood* 1998;92:2147-56.

¹⁵ Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, Avent ND, Daniels G. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *Br J Haematol*. 1998;103:1184-91.

¹⁶ Castilho L, Rios M, Pellegrino J Jr, Saad ST, Costa FF, Reid ME. A novel FY allele in Brazilians. *Vox Sang*. 2004;87:190-5.

¹⁷ Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995;10:224-8.

¹⁸ Iwamoto S, Li J, Sugimoto N, Okuda H, Kajii E. Characterization of the Duffy gene promoter: evidence for tissue-specific abolishment of expression in Fy(a-b-) of black individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 24;222:852-9.

¹⁹ Rios M, Reid ME, Naime D, Chaudhuri A, Pogo AO, Bianco C. Importance of GATA box analysis in genotyping for the Duffy blood group system. *Transfusion* 1997; 37(Suppl 9S):101S, Abstract.

²⁰ Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*. 1975;189:561-3.

²¹ Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype FyFy. *N Engl J Med*. 1976;295:302-4.

²² Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA which encodes the major subunit of the Duffy

blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. (1993) *Proc Natl Acad Sci* 15;90:10793-7.

²³ Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hebert CA, Valente AJ, Baker JB. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 1991;88(4):1362-9.

²⁴ Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261:1182-4.

²⁵ Van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, Van de Ven MT, Ven der Meer JW, Corstens FH. The kinetics of radiolabelled interleukin-8 in infection and sterile inflammation. *Nucl Med Commun* 1998;19(3):271-81.

²⁶ de Winter RJ, Manten A, de Jong YP, Adams R, van Deventer SJ, Lie KI. Interleukin 8 released after acute myocardial infarction is mainly bound to erythrocytes. *Heart* 1997;78(6):598-602.

²⁷ Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Aderka D, Kemper O, Hornik V, Holtmann H, Brakebusch C. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl.* 1991;35:51-7.

²⁸ Aggarwal, B.B., Reddy, S., 1994. Tumour necrosis factor. In: Nicola, N.A. *Guidebook to Cytokines and their Receptors*. Oxford University Press, Oxford, pp. 103-4.

²⁹ Munoz J, Albillos A, Perez-Paramo M, Rossi I, Alvarez-Mon M. Factors mediating haemodynamic effects of tumor necrosis factor- α in portal hypertensive rats. *Am. J. Physiol* 1999;276:687-93.

- ³⁰ Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Reitsma PH, Khaw KT. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1503-8.
- ³¹ Stallmach T, Hebisch G, Joller H, Kolditz P, Engelmann M. Expression pattern of cytokines in the different compartments of the feto-maternal unit under various conditions. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:1573-80.
- ³² Velzing-Aarts FV, van der Dijs FP, Muskiet FA, Duits AJ. The association of pre-eclampsia with the Duffy negative phenotype in women of West African descent. *BJOG* 2002;109:453-5.
- ³³ Velzing-Aarts FV, Muskiet FA, van der Dijs FP, Duits AJ. High serum interleukin-8 levels in afro-caribbean women with pre-eclampsia. Relations with tumor necrosis factor-alpha, duffy negative phenotype and von Willebrand factor. *Am J Reprod Immunol* 2002;48:319-22.
- ³⁴ Fernando Nobre, Carlos V Serrano Jr. Tratado de Cardiologia SOCESP. 1ª edição 2005 Barueri SP Brasil, Ed Manole pág 395-404.
- ³⁵ IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Cap. 2 pag. 5 - fevereiro de 2002. Campos do Jordão – São Paulo.
- ³⁶ Fernando Nobre, Carlos V Serrano Jr. Tratado de Cardiologia SOCESP. 1ª edição 2005 Barueri SP Brasil, Ed Manole pág 436-45.
- ³⁷ Bortolotto LA. Hipertensão renovascular e hipertensão maligna: aspectos atuais. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2003;13:130-47.

- ³⁸ Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42:1206-52.
- ³⁹ Chown B, Lewis M, Kaita H. The Duffy blood group system in caucasians: evidence for a new allele. *American Journal of Human Genetics* 1965;17:384-9.
- ⁴⁰ Lewis M, Kaita H, Chown B. The Duffy blood group system in caucasians. A further population sample. *Vox sang* 1972;23:523-7.
- ⁴¹ Albrey JA, Vincent EE, Hutchinson J, Marsh WL, Allen FH Jr, Gavin J, Sanger R. A new antibody, anti-Fy3, in the Duffy blood group system. *Vox Sang*. 1971;20:29-35.
- ⁴² Behzad O, Lee CL, Gavin J, Marsh WL. A new anti-erythrocyte antibody in the Duffy system: anti-Fy4. *Vox Sang* 1973;24:337-42.
- ⁴³ Colledge KI, Pezzulich M, Marsh WL. Anti-Fy5, and antibody disclosing a probable association between the Rhesus and Duffy blood group genes. *Vox Sang* 1973;24:193-9.
- ⁴⁴ Nichols ME, Rubinstein P, Barnwell J, Rodriguez de Cordoba S, Rosenfield RE. A new human Duffy blood group specificity defined by a murine monoclonal antibody. Immunogenetics and association with susceptibility to *Plasmodium vivax*. *J Exp Med*. 1987 1;166:776-85.

- ⁴⁵ Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med*. 1989 1;169:1795-802.
- ⁴⁶ Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-39.
- ⁴⁷ Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/Fyb blood group polymorphism. *Hum Genet*. 1995;95:407-10.
- ⁴⁸ Wasniowska K, Lisowska E, Halverson GR, Chaudhuri A, Reid ME. The Fya, Fy6 and Fy3 epitopes of the Duffy blood group system recognized by new monoclonal antibodies: identification of a linear Fy3 epitope. *Br J Haematol*. 2004;124:118-22.
- ⁴⁹ Cedergren B, Giles CM. An Fy^xFy^x individual found in northern sweden. *Vox Sang* 1973;24:264-6.
- ⁵⁰ Buchanan DE, Sinclair M, Sanger R, Gavin J, Teesdale P. An Alberta Cree Indian with a rare Duffy antibody anti-Fy3. *Vox Sang* 1976;30:114-21.
- ⁵¹ Habibi B, Perrier P, Salmon C. HD50 assay evolution of the antigens Fy3 depression in Fy^x individuals. *J Immunogenet* 1980;7:191-3.
- ⁵² Le Pennec PY, Rouger P, Klein MT, Robert N, Salmon C. Study of anti-Fya in five black Fy(a-b-) patients. *Vox Sang*. 1987;52:246-9.

- ⁵³ Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens. *Transfusion*. 2000;40:310-20.
- ⁵⁴ Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Akesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*. 1998;38:168-73.
- ⁵⁵ Zimmerman PA, Woolley I, Masinde GL, Miller SM, McNamara DT, Hazlett F, Mgone CS, Alpers MP, Genton B, Boatin BA, Kazura JW. Emergence of FY*A(null) in a Plasmodium vivax-endemic region of Papua New Guinea. *Proc Natl Acad Sci*. 1999 23;96:13973-7.
- ⁵⁶ Langhi Jr DM, Albuquerque S, Covas DT, Perez CA, Bordim JO. Presença do alelo *FYAnull*, do sistema de grupo sanguíneo Duffy em habitantes de região endêmica para malária e doadores de sangue no Brasil. *Rev Bras Hemat Hemot* 2004;26:268-9.
- ⁵⁷ Shimizu Y, Kimura M, Settheetham-Ishida W, Duangchang P, Ishida T. Serotyping of Duffy blood group in several Thai ethnic groups. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28:32-5.
- ⁵⁸ Shimizu Y, Ao H, Soemantri A, Tiwawech D, Settheetham-Ishida W, Kayame OW, Kimura M, Nishioka T, Ishida T. Sero- and molecular typing of Duffy blood group in Southeast Asians and Oceanians. *Hum Biol*. 2000;72:511-8.
- ⁵⁹ Lewis GE Jr, Miller LH, Ibrahim L, Wong PW, McGinniss M, Ooi WL. Duffy phenotypes in Malaysian populations: correction of previous unusual findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82:509-10.

-
- ⁶⁰ Rios M, Chaudhuri A, Mallinson G, Sausais L, Gomensoro-Garcia AE, Hannon J, Rosenberger S, Poole J, Burgess G, Pogo O, Reid M. New genotypes in Fy(a-b-) individuals: nonsense mutations (Trp to stop) in the coding sequence of either FY A or FY B. *Br J Haematol* 2000;108:448-4.
- ⁶¹ Reid ME, Lomas-Francis C. The blood group antigen. *Facts book*, 2st edn.2004. California, Academic Press.
- ⁶² Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Blanchard D, Proudfoot AE, Cartron JP, Colin Y. Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding. *J Biol Chem*. 1997 27;272:16274-80.
- ⁶³ Judson PA, Anstee DJ. Comparative effect of trypsin and chymotrypsin on blood group antigens. *Med Lab Sci*. 1977;34:1-6.
- ⁶⁴ Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood*. 1997;89:3077-91.
- ⁶⁵ Woolley IJ, Hotmire KA, Sramkoski RM, Zimmerman PA, Kazura JW. Differential expression of the duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transfusion* 2000;40:949-53.
- ⁶⁶ Novaretti MCZ, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF - Estudo de grupos sangüíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides da cidade de São Paulo. *Rev Bras Hemat Hemot* 2000;22:23-32.
- ⁶⁷ Moulds JM, Hayes S, Wells TD. DNA analysis of Duffy genes in American blacks. *Vox Sang*. 1998;74:248-52.

⁶⁸ Sandler SG, Schiliro G, Russo A, Musumeci S, Rachmilewitz EA. Blood group phenotypes and the origin of sickle cell hemoglobin in Sicilians. *Acta Haematol.* 1978;60:350-7.

⁶⁹ Daniels G, Poole J, de Silva M, Callaghan T, Mac Lennan S, Smith N. The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med* 2002;12:287-95.

⁷⁰ Szymanski IO, Huff SR, Delsignore R. An autoanalyzer test to determine immunoglobulin class and IgG subclass of blood group antibodies. *Transfusion* 1982;22:90-5.

⁷¹ Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, editors. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 2005 11^a edition Great Britain, UK: Blackwell Science. Pg 215.

⁷² Issitt PD, Anstee DJ, editors. *Applied Blood Group Serology*, 4 th edn. 1998 Durban, North Carolina E.U.A: Montgomery Scientific Publications. Pg 440-1.

⁷³ Kim HH, Park TS, Oh SH, Chang CL, Lee EY, Son HC. Delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-Fyb caused by a primary immune response: a case study and a review of the literature. *Immunohematol.* 2004;20:184-6.

⁷⁴ Palatinik M, Junqueira PC, Alves ZMS. Fs: an antigenic determinant possible related to the Duffy blood group. *Rev Franc Transfus Immuno-Hémat* 1982;25:629-37.

⁷⁵ Riwoom S, Janvier D, Navenot JM, Benbunan M, Muller JY, Blanchard D. Production of a new murine monoclonal antibody with Fy6 specificity and characterization of the immunopurified N-glycosylated Duffy-active molecule. *Vox Sang.* 1994;66:61-7.

⁷⁶ Wasniowska K, Petit-LeRoux Y, Tournamille C, Le van Kim C, Cartron JP, Colin Y, Lisowska E, Blanchard D. Structural characterization of the epitope

recognized by the new anti-Fy6 monoclonal antibody NaM 185-2C3. *Transfus Med.* 2002;12:205-11.

⁷⁷ Westhoff CM, Reid ME. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematol.* 2004;20:37-49.

⁷⁸ Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy(a) and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med.* 1997;7:301-4.

⁷⁹ Weinstein L, Taylor ES. Hemolytic disease of the neonate secondary to anti-Fya. *Am J Obstet Gynecol.* 1975 1;121:643-5.

⁸⁰ Babinszki A, Berkowitz RL. Haemolytic disease of the newborn caused by anti-c, anti-E and anti-Fya antibodies: report of five cases. *Prenat Diagn.* 1999;19:533-6.

⁸¹ Dufour P, Vinatier D, Bernardi C, Ezzedine M, Fonteyne G, Monnier JC, Mannessier L. Severe fetomaternal anti-Duffy allo-immunization. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 1991;20:809-14.

⁸² Toivanen P, Hirvonen T. Antigens Duffy, Kell, Kidd, Lutheran and Xg a on fetal red cells. *Vox Sang.* 1973;24:372-6.

⁸³ Cook SG, Baker JW, Weaver EW. Intrauterine transfusion for anti-Duffy(Fya) haemolytic disease. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1989;29:263-4.

⁸⁴ Geifman-Holtzman O, Wojtowycz M, Kosmas E, Artal R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol.* 1997;89:272-5..

- ⁸⁵ Hessner MJ, Pircon RA, Johnson ST, Luhm RA. Prenatal genotyping of the Duffy blood group system by allele-specific polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* 1999;19:41-5.
- ⁸⁶ Donahue, R. P.; Bias, W. B.; Renwick, J. H.; McKusick, V. A. (1968) Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61: 949-55.
- ⁸⁷ Dracopoli NC, O'Connell P, Elsner TI, Lalouel JM, White RL, Buetow KH, Nishimura DY, Murray JC, Helms C, Mishra SK, et al. The CEPH consortium linkage map of human chromosome 1. *Genomics* 1991;9:686-700.
- ⁸⁸ Neote K, Mak JY, Kolakowski LF Jr, Schall TJ. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 1994;84:44-52.
- ⁸⁹ Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: a malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol.* 2000;37:122-9..
- ⁹⁰ Moore S, Woodrow CF, McClelland DBL. Isolation of membrane components associated with human red cell antigens Rho(D), (c), (E) and Fy^a. *Nature* 1982;295:529-31.
- ⁹¹ Hadley TJ, David PH, McGinnis MH, Miller LH. Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group antigens Fy^a antigen. *Science* 1984;223:597-9.
- ⁹² Tanner MJ, Anstee DJ, Mallinson G, Ridgwell K, Martin PG, Avent ND, Parsons SF. Effect of endoglycosidase F-peptidyl N-glycosidase F preparations on the surface components of the human erythrocyte. *Carbohydr Res.* 1988 15;178:203-12.

- ⁹³ Masouredis SP, Sudora E, Mahan L, Victoria EJ. Quantitative immunoferritin microscopy of Fya, Fyb, Jka, U, and Dib antigen site numbers on human red cells. *Blood*. 1980;56:969-77.
- ⁹⁴ de Brevern AG, Wong H, Tournamille C, Colin Y, Le Van Kim C, Etchebest C. A structural model of a seven-transmembrane helix receptor: the Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC). *Biochim Biophys Acta*. 2005 5;1724:288-306.
- ⁹⁵ Singh SK, Hora R, Belrhali H, Chitnis CE, Sharma A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. *Nature*. 2006 9;439:741-4.
- ⁹⁶ Hesselgesser J, Horuk R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol*. 1999;5:13-26.
- ⁹⁷ Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hesselgesser J, Horuk R. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest* 1994;94:985-91.
- ⁹⁸ Peiper SC, Wang ZX, Neote K, Martin AW, Showell HJ, Conklyn MJ, Osborne K, Hadley TJ, Lu ZH, Hesselgesser J, Horuk R. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med*. 1995 1;181:1311-7.
- ⁹⁹ Chaudhuri A, Nielsen S, Elkjaer ML, Zbrzezna V, Fang F, Pogo AO. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. *Blood*. 1997 15;89:701-12.

-
- ¹⁰⁰ Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial*. Guanabara Koogan 2001 2^o edição. Cap 25: 263-73.
- ¹⁰¹ Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol*. 1978;77:72-82.
- ¹⁰² Miller LH, Aikawa M, Johnson JG, Shiroishi T. Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med*. 1979;149:172-84.
- ¹⁰³ Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtali R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:575-81.
- ¹⁰⁴ Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC, Alves RT, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101:1042-4.
- ¹⁰⁵ Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 1;90:909-28.
- ¹⁰⁶ Walz W, Calandra T, Koth M, KotbM. *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Humana Press 2003. Chap 11:248-9.
- ¹⁰⁷ Horuk R, Colby TJ, Darbonne WC, Schall TJ, Neote K. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. *Biochemistry*. 1993 8;32:5733-78.

-
- ¹⁰⁸ Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:653-88.
- ¹⁰⁹ Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem.* 1993 15;268:12247-9.
- ¹¹⁰ Chaudhuri A, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;269:7835-8.
- ¹¹¹ Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:593-633.
- ¹¹² Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. Manole LTDA 1997 4^o edição. Cap 8.11.
- ¹¹³ Tournamille C. Bases moléculaires et relations structure-fonction des antigènes de groupe sanguin Duffy: récepteur de chimiokines et de *Plasmodium vivax*. *Transfus Clin Biol.* 2000;7:497-509.
- ¹¹⁴ Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell.* 1997 31;91:385-95.
- ¹¹⁵ Lee JS, Frevert CW, Wurfel MM, Peiper SC, Wong VA, Ballman KK, Ruzinski JT, Rhim JS, Martin TR, Goodman RB. Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2003 15;170:5244-51.

- ¹¹⁶ Dawson TC, Lentsch AB, Wang Z, Cowhig JE, Rot A, Maeda N, Peiper SC. Exaggerated response to endotoxin in mice lacking the Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC). *Blood*. 2000 1;96:1681-4.
- ¹¹⁷ Luo H, Chaudhuri A, Zbrzezna V, He Y, Pogo AO. Deletion of the murine Duffy gene (Dfy) reveals that the Duffy receptor is functionally redundant. *Mol Cell Biol*. 2000;20:3097-101. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2003;23:3030.
- ¹¹⁸ Liu XH, Hadley TJ, Xu L, Peiper SC, Ray PE. Up-regulation of Duffy antigen receptor expression in children with renal disease. *Kidney Int*. 1999;55:1491-1500.
- ¹¹⁹ Segerer S, Regele H, Mack M, Kain R, Cartron JP, Colin Y, Kerjaschki D, Schlondorff D. The Duffy antigen receptor for chemokines is up-regulated during acute renal transplant rejection and crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2000;58:1546-56.
- ¹²⁰ Segerer S, Bohmig GA, Exner M, Colin Y, Cartron JP, Kerjaschki D, Schlondorff D, Regele H. When renal allografts turn DARC. *Transplantation* 2003 15;75: 1030-4.
- ¹²¹ Akalin E, Neylan JF. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. *Transplantation*. 2003 15;75:1496-1500.
- ¹²² Lee JS, Frevert CW, Thorning DR, Segerer S, Alpers CE, Cartron JP, Colin Y, Wong VA, Martin TR, Goodman RB. Enhanced expression of Duffy antigen in the lungs during suppurative pneumonia. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:159-66.
- ¹²³ Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 20;321:306-12.

- ¹²⁴ Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:195-200.
- ¹²⁵ Moldovan NI. Tissular insemination of progenitor endothelial cells: the problem, and a suggested solution. *Adv Exp Med Biol.* 2003;522:99-113.
- ¹²⁶ Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003 15;170:3369-76.
- ¹²⁷ Xu L, Ashkenazi A, Chaudhuri A. Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) attenuates angiogenesis by causing senescence in endothelial cells. *Angiogenesis.* 2007;10:307-18.
- ¹²⁸ Moore BB, Arenberg DA, Stoy K, Morgan T, Addison CL, Morris SB, Glass M, Wilke C, Xue YY, Sitterding S, Kunkel SL, Burdick MD, Strieter RM. Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am J Pathol* 1999;154:1503–12.
- ¹²⁹ Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? *FASEB J.* 2002;16:1093-5.
- ¹³⁰ Comerford I, Litchfield W, Harata-Lee Y, Nibbs RJ, McColl SR. Regulation of chemotactic networks by 'atypical' receptors. *Bioessays.* 2007;29:237-47.
- ¹³¹ Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001;2:123-8..
- ¹³² Murphy PM. International Union of Pharmacology. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev.* 2002;54:227-9.

- ¹³³ Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:145-76.
- ¹³⁴ Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006 9;354:610-21.
- ¹³⁵ Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998 16;187:875-83.
- ¹³⁶ Wallace GR, John Curnow S, Wloka K, Salmon M, Murray PI. The role of chemokines and their receptors in ocular disease. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23:435-48.
- ¹³⁷ Cameron MJ, Kelvin DJ. Cytokines and chemokines--their receptors and their genes: an overview. *Adv Exp Med Biol.* 520:8-32.
- ¹³⁸ Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 1996 28;85:1135-48.
- ¹³⁹ Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature.* 1996 20;381:667-73.
- ¹⁴⁰ O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev.* 2000;177:99-111.

- ¹⁴¹ Wang J, Huang M, Lee P, Komanduri K, Sharma S, Chen G, Dubinett SM. Interleukin-8 inhibits non-small cell lung cancer proliferation: a possible role for regulation of tumor growth by autocrine and paracrine pathways. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16:53-60.
- ¹⁴² Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis.* 2002 1;186 Suppl 2:S152-56.
- ¹⁴³ Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:143-54.
- ¹⁴⁴ Dong VM, McDermott DH, Abdi R. Chemokines and diseases. *Eur J Dermatol.* 2003;13:224-30.
- ¹⁴⁵ Loetscher P, Moser B. Homing chemokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4:233-36.
- ¹⁴⁶ Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:675-705.
- ¹⁴⁷ Sørensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103:807-15.
- ¹⁴⁸ Moreira MA, Souza AL, Lana-Peixoto MA, Teixeira MM, Teixeira AL. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39:441-5.

- ¹⁴⁹ Teixeira AL Jr, Cardoso F, Souza AL, Teixeira MM. Increased serum concentrations of monokine induced by interferon-gamma/CXCL9 and interferon-gamma-inducible protein 10/CXCL-10 in Sydenham's chorea patients. *J Neuroimmunol.* 2004 ;150:157-62.
- ¹⁵⁰ Hack CE, Hart M, van Schijndel RJ, Eerenberg AJ, Nuijens JH, Thijs LG, Aarden LA. Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun.* 1992 ;60:2835-42.
- ¹⁵¹ Yokoyama T, Kanda T, Kobayashi I, Suzuki T. Serum levels of interleukin-8 as a marker of disease activity in patients with chronic sarcoidosis. *J Med.* 1995;26:209-19.
- ¹⁵² Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci.* 1992 ;82:273-5.
- ¹⁵³ Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax.* 2002 ;57:590-5.
- ¹⁵⁴ Gerhardt CC, Romero IA, Cancellio R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 25;175:81-92.
- ¹⁵⁵ Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998 ;2:275-281.
- ¹⁵⁶ Schlöndorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B. Chemokines and renal disease. *Kidney Int.* 1997;51:610-21.

- ¹⁵⁷ Segerer S, Nelson PJ, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*. 2000;15:2-76.
- ¹⁵⁸ Fernando Nobre, Carlos V Serrano Jr. Tratado de Cardiologia SOCESP. 1ª edição 2005 Barueri SP Brasil, Ed Manole pág 440.
- ¹⁵⁹ Casey AE, Hale K, Casey JG, Holland C, Downey-Prince E, Phillips M. Blood group-anthropometric profiles of constitutional variation and susceptibility to disease. *Ala J Med Sci*. 1978;15:352-62.
- ¹⁶⁰ Franco MHLF, Salzano FM, Lima FAM de. Blood groups and serum protein types in two brazilian populations. *Rev Bras Genet*. 1981;4:689-704.
- ¹⁶¹ Brecher ME. *Technical Manual* 15th ed. Bethesda, Maryland: American Association of Blood Banks; 2005.
- ¹⁶² Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-91.
- ¹⁶³ Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 20;230:1350-4.
- ¹⁶⁴ Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:499-506.
- ¹⁶⁵ Schillaci G, Pirro M, Gemelli F, Pasqualini L, Vaudo G, Marchesi S, Siepi D, Bagaglia F, Mannarino E. Increased C-reactive protein concentrations in never-treated hypertension: the role of systolic and pulse pressures. *J Hypertens*. 2003 ;21:1841-6.

- ¹⁶⁶ Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 1999 ;34:113-17.
- ¹⁶⁷ Hilgers KF. Monocytes/macrophages in hypertension. *J Hypertens*. 2002 ;20:593-6.
- ¹⁶⁸ Grundy SM. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. *JAMA*. 2003 10;290:3000-2.
- ¹⁶⁹ Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA*. 2003 10;290:2945-51.
- ¹⁷⁰ Bautista LE, López-Jaramillo P, Vera LM, Casas JP, Otero AP, Guaracao AI. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J Hypertens*. 2001 ;19(5):857-61.
- ¹⁷¹ Birrell MA, Wong S, Catley MC, Belvisi MG. Impact of tobacco-smoke on key signaling pathways in the innate immune response in lung macrophages. *J Cell Physiol*. 2008;214:27-37.
- ¹⁷² Gonzalez-Quintela A, Campos J, Gude F, Perez LF, Tomé S. Serum concentrations of interleukin-8 in relation to different levels of alcohol consumption. *Cytokine*. 2007;38:54-60.
- ¹⁷³ Kauma S, Takacs P, Scordalakes C, Walsh S, Green K, Peng T. Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2002; 100:706–14.
- ¹⁷⁴ Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2007 ;97:714-21.

- ¹⁷⁵ Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003 28;107:499-511.
- ¹⁷⁶ Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 ;24:1997-2008.
- ¹⁷⁷ Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Brugaletta S, Liuzzo G, Biasucci LM. C-reactive protein and other inflammatory biomarkers as predictors of outcome following acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med*. 2003;3:375-84.
- ¹⁷⁸ Kobusiak-Prokopowicz M, Orzeszko J, Mazur G, Mysiak A, Orda A, Mazurek W. Kinetics of chemokines in acute myocardial infarction. *Kardiol Pol*. 2005 ;62:301-14.