



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ROSÂNGELA PINHEIRO GONÇALVES MACHADO

MODULAÇÃO GENÉTICA DO BCL11A NO PERFIL INFLAMATÓRIO,
HEMOLÍTICO, ESTRESSE OXIDATIVO E NOS NÍVEIS DE
HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

FORTALEZA

2015

ROSÂNGELA PINHEIRO GONÇALVES MACHADO

MODULAÇÃO GENÉTICA DO BCL11A NO PERFIL INFLAMATÓRIO,
HEMOLÍTICO, ESTRESSE OXIDATIVO E NOS NÍVEIS DE
HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de
Medicamentos da Universidade Federal do Ceará
para a Obtenção do Título de Doutor em
Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de
Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M133p Machado, Rosângela Pinheiro Gonçalves

Modulação genética do BCL11A no perfil inflamatório hemolítico, estresse oxidativo e nos níveis de hemoglobina fetal em pacientes com anemia falciforme./ Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado. – 2015.
88f.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Alice Maria Costa Martins.

1. Anemia falciforme. 2. Polimorfismo genético. 3. Hemoglobina fetal. 4. Inflamação. 5. Diálise renal. 6. Estresse oxidativo. I. Título

CDD: 616.1527

ROSÂNGELA PINHEIRO GONÇALVES MACHADO

MODULAÇÃO GENÉTICA DO BCL11A NO PERFIL INFLAMATÓRIO,
HEMOLÍTICO, ESTRESSE OXIDATIVO E NOS NÍVEIS DE
HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins

Aprovada em: 22/ 06/ 2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Expedito Rogildo Cordeiro Carlos
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Iêda Pereira de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico à Deus que permitiu a conclusão dessa etapa importante da minha vida.

À minha irmã Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, que esteve presente durante todo o processo, por incentivar, colaborar e acreditar no êxito desse ideal.

Ao meu irmão Ronaldo Pinheiro Gonçalves, *"in memoriam"*, pelo exemplo de dedicação, esforço, incentivo e amor que representou na minha vida, em vários aspectos. Saudades!

Ao meu esposo Régis e aos meus filhos: Rebeca, Clarissa, Lucas, Samuel e Talita, que com suas existências preenchem a minha vida com alegrias.

Aos meus pais Vicente e Marlene, pelo dom da vida que me concederam e exemplos de pessoas amigas, incentivadoras, amorosas.

Aos meus irmãos Vicente Filho e Roneide e a todos os meus familiares, que completam minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus provedor maior de todos os acontecimentos da minha vida.

À minha orientadora Alice Maria Costa Martins, por ser mais que uma orientadora: uma amiga paciente, acolhedora e respeitosa nos momentos difíceis pelos quais passei.

Aos pacientes, que aceitaram em participar da pesquisa, por acreditarem nos nossos objetivos, tornando possível sua concretização, motivo maior do nosso estudo.

À todos os meus familiares, pelo incentivo, apoio, despreendimento e amor.

Às minhas colegas de doutorado Izabel e Maritza que tiveram importante participação na conclusão desta pesquisa.

Aos mestrandos e doutorandos do Laboratório de pesquisa em hemoglobinopatias e doenças genéticas hematológicas (LPHDGH), pela solidariedade e disponibilidade.

Aos mestrandos e doutorandos do Laboratório de Cultivo Celular (LCC), pelo coleguismo e acolhimento.

A todos os colegas, mestrandos e doutorandos, do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPgDITM), pela amizade e solidariedade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPgDITM) que se tornaram parte importante para a conclusão desse projeto. Aos funcionários do PPgDITM, especialmente a Raimundinha e Jéssica, amigas e solícitas.

A todos os colegas do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), destacando a direção, pelo incentivo e compreensão em todos os momentos.

A todos os colegas do Hospital Distrital Gonzaga Mota de Messejana, especialmente à direção, pelo apoio fundamental.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária autossômica causada por uma mutação pontual no gene da beta globina gerando uma hemoglobina anormal denominada de hemoglobina S (HbS), em homozigose. A doença se caracteriza por apresentar uma variabilidade do quadro clínico, que se deve à múltiplos fatores, dentre eles a concentração de hemoglobina fetal (HbF), os haplótipos do gene da beta globina e os polimorfismos do gene *BCL11A*, entre outros. A avaliação dos moduladores genéticos na AF tem sido desenvolvida com a finalidade de melhorar o entendimento da sua fisiopatologia e direcionar a abordagem terapêutica objetivando sua individualização. A pesquisa se propôs a determinar a modulação genética dos polimorfismos do gene *BCL11A* (rs4671393, rs7557939 e rs1186868) sobre o perfil inflamatório, hemolítico, no estresse oxidativo e nas concentrações das HbF, HbS nos pacientes portadores de AF, em estado estacionário. O estudo foi do tipo transversal e analítico com 42 pacientes adultos, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), com diagnóstico molecular e haplótipos do gene da beta globina S previamente realizados. Os pacientes estavam em uso de Hidroxiuréia (HU), em média, 20mg/kg de peso corporal. Amostras biológicas de sangue periférico foram obtidas para a realização dos exames laboratoriais: as dosagens das citocinas pró inflamatórias IL-6, IL-17, TNF-alpha e das antiinflamatórias IL-10 e TGF-beta, por Elisa; contagem de reticulócitos por metodologia manual, dosagem de metemoglobina (MetHb) e lactato desidrogenase (LDH), por espectrofotometria; do nitrito (NOx), malonaldeído (MDA) séricos, as enzimas antioxidantes eritrocitárias, catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx) por kits e espectrofotometria. Os polimorfismos genéticos do gene *BCL11A* nas regiões, rs4671393, rs7557939 e rs1186868 foram determinados por Real Time PCR. As dosagens da HbF e HbS foram realizadas por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Os dados idade, sexo e eventos clínicos foram obtidos dos prontuários. Toda a análise estatística foi realizada usando o software livre R, na versão 3.1.2. Para análise da frequência do sexo e dos genótipos, por região e das associações entre o tipo de haplótipo e dos eventos clínicos com as regiões do *BCL11A*, foram usados os testes de Qui-quadrado e o exato de Fisher. Realizou-se o teste paramétrico de ANOVA (obtido sob suposições distribucionais), bem como o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise da associação dos genótipos do gene *BCL11A* com a idade, os níveis de HbS, HbF, perfil inflamatório, hemolítico e do estresse oxidativo. Foi considerado significativo ao nível de 5%. A maioria dos pacientes (57,14%) era do sexo feminino. A idade dos pacientes incluídos foi de 18 a 65 anos, com valor médio e mediano de 35,1 e 33 anos, respectivamente. Somente a rs7557939 do *BCL11A*, o genótipo A/G foi o mais prevalente e a prevalência do genótipo A/G foi maior nas mulheres, enquanto nos homens a prevalência maior foi do genótipo A/A. No entanto, a rs1186868 do *BCL11A*, a maioria (56,52%) das mulheres apresentaram o genótipo C/T e a metade dos homens apresentaram o genótipo T/T. Nenhuma região do gene *BCL11A* apresentou associação significativa com os

haplótipos do gene da beta globina S. Em relação a modulação do gene BCL11A com os níveis de HbS e HbF, verificou-se que na rs1186868 houve resultado significativo do genótipo mutante T/T, que apresentou maiores níveis de HbS e menores níveis de HbF. Na rs7557939 houve uma diminuição significativa de HbF no alelo mutante A/A, porém, não houve relação com a HbS. Não houve associação entre os SNPs, nas três regiões estudadas, com relação ao número médio/mediano dos moduladores inflamatórios, marcadores de hemólise, do estresse oxidativo e dos eventos clínicos, ao nível de 5%. Os achados reforçam a hipótese da modulação genética dos polimorfismos do gene BCL11A em relação aos níveis de HbF, onde os alelos selvagens, nas regiões rs7557939 e rs1186868 apresentaram um caráter protetor no prognóstico em decorrência de terem apresentado aumento dos níveis de HbF, nos pacientes com AF do estudo.

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Polimorfismo Genético, Hemoglobina fetal , Inflamação, Diálise renal, Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal hereditary hemoglobinopathies caused by a point mutation in the beta globin gene generates an abnormal hemoglobin called hemoglobin S (Hb S) in homozygous. The disease is characterized by presenting a variability of symptoms, which is due to multiple factors, including fetal hemoglobin (HbF), the haplotypes of the beta globin gene and polymorphisms BCL11A gene, among others. The assessment of genetic modulators in AF has been developed in order to improve the understanding of its pathophysiology and direct therapeutic approach aiming his individualization. The research set out to determine the genetic modulation of polymorphisms BCL11A gene (rs4671393, rs7557939 and rs1186868) on the inflammatory profile, hemolytic, oxidative stress and the concentrations of HbF, Hb in patients with AF, in steady state. The study was cross and analytical type with 42 adult patients receiving outpatient treatment at the University Hospital Walter Cantídio (HUWC), with molecular diagnostics and haplotypes of the beta globin gene S previously realized. The patients were taking hydroxyurea (HU), on average 20 mg / kg body weight. Biological samples of peripheral blood were obtained for performing laboratory tests: The dosages of IL-6 pro-inflammatory cytokine, IL-17, TNF-alpha and IL-10 and anti-inflammatory TGF-beta by ELISA; reticulocyte counts by the manual method, dosage methemoglobin (MetHb) and lactate dehydrogenase (LDH) by spectrophotometry; nitrite (NOx), malondialdehyde (MDA) serum, erythrocyte antioxidant enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) for kits and spectrophotometry. Genetic polymorphisms of BCL11A gene regions, rs4671393, rs7557939 and rs1186868 were determined by Real Time PCR. Dosages of HbF, and HbS were performed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The data age, sex and clinical events were obtained from medical records. All statistical analysis was performed using the free software R, in version 3.1.2. To analyze the frequency of sex and genotype by region and associations between the type of haplotype and clinical events with the regions of BCL11A, they used the chi-square test and Fisher's exact. Held the ANOVA parametric test (obtained under distributional assumptions), and the non-parametric Kruskal-Wallis to analyze the association of genotypes BCL11A gene with age, the levels of Hb, HbF, inflammatory profile, hemolytic and oxidative stress. It was considered significant at the 5% level. Most patients (57.14%) were female. The age of the included patients was 18-65 years, mean and median value of 35.1 and 33 years respectively. Only rs7557939 of BCL11A, genotype A / G was the most prevalent and the prevalence of genotype A / G was higher in women, while in men the highest prevalence was genotype A / A. However, rs1186868 of BCL11A, the majority (56.52%) of women had the C / T genotype and half the men showed the T / T genotype. No BCL11A region of the gene showed a significant association with haplotype S beta-globin gene Regarding gene BCL11A modulação the levels of HbF, and HbS, it was found that there was a significant rs1186868 results in the mutant genotype T / T, showed higher levels of

Hb and lower levels of HbF. In rs7557939 there was a significant decrease in HbF in the mutant allele A / A, however, there was no relationship with the HbS. There was no association between SNPs in the three regions studied, with the average number / median of inflammatory modulators, hemolysis markers of oxidative stress and clinical events at the level of 5% .The findings reinforce the hypothesis of genetic modulation of BCL11A gene polymorphisms in relation to levels of HbF, where the wild allele, rs7557939 and rs1186868 in the regions had a protective character in prognosis decorência of referral increased levels of HbF in patients with AF study.

Keywords: Sickle Cell Anemia, Genetic polymorphism, Fetal hemoglobin, Inflammation, Renal dialysis, Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação dos cromossomos 11, 16 e das das moléculas de Hb F e A.....
- Figura 2 Representação da molécula da hemoglobina normal do adulto formada pelas cadeias globínicas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$ e um anel tetrapirrólico heme, ao centro.....
- Figura 3 Mecanismos patofisiológicos na anemia falciforme (AF).....
- Figura 4 Mecanismos envolvidos na vasculopatia e hemólise na anemia falciforme (AF).....
- Figura 5 Equilíbrio entre ROS e antioxidantes.....
- Figura 6 Principais haplótipos do “cluster” gênico da β -globina.....
- Figura 7 Representação do cromossomo 2 e indicação (seta) da localização do polimorfismo do gene BCL11A.....
- Figura 8 Distribuição dos pacientes segundo o sexo.....
- Figura 9 Distribuição do sexo segundo genótipo por região.....
- Figura 10 Avaliação da Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868), no perfil médio(\pm erro-padrão da média) da idade, por genótipo e região.....
- Figura 11 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene BCL11A para cada uma das três regiões.
- Figura 12 Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868), na concentrações da HbS, nos pacientes com AF (n=42).
- Figura 13 Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868), na concentrações da HbF, nos pacientes com AF (n=42).
- Figura 14 Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF-alfa e IL-17), nos pacientes com AF (n=42).
- Figura 15 Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- β), nos pacientes com AF (n=42).
- Figura 16 Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores de hemólise (MetHb, Ret, LDH), nos pacientes com AF (n=42).
- Figura 17 Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores do estresse oxidativo , oxidantes (MDA e nitrito) e os anti-oxidantes (CAT, GPx), nos pacientes com AF (n=42).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatísticas descritivas das variáveis idade, Hemoglobina Fetal (%) e Hemoglobina S (%) dos pacientes incluídos no estudo.....
Tabela 2	Valores-p dos testes para igualdade entre proporções dos genótipos por região.....
Tabela 3	Valores-p dos testes de associação entre sexo e genótipo, por região.
Tabela 4	Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas das idades por genótipo, para cada uma das regiões.
Tabela 5	Valores-p dos testes de associação entre o tipo de haplótipo e as regiões do BCL11A
Tabela 6	Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas de HBS (%) dos genótipos por região.
Tabela 7	Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas de HbF (%) dos genótipos por região.
Tabela 8	Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas dos moduladores inflamatórios, marcadores de hemólise e de estresse oxidativo por genótipo e região.
Tabela 9	Valores-p dos testes de associação entre os eventos clínicos e a frequência dos genótipos, por região.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA= dimetilarginina assimétrica (*Asymmetric dimethylarginine*)
AF= anemia falciforme
Apo A= apolipoproteína A
AST= asparato aminotransferase
AVC= acidente Vascular cerebral
BCL11A= gene BCL11A
CT = limiar do ciclo (*cycle threshold*)
CAT= catalase
Células F = eritrócito com hemoglobina fetal
Ciclo GMPc = monofosfato cíclico de guanosina
CD-36= "*clusters of differentiation- 36*"
Cr 2 = cromossomo 2
Cr 6 = cromossomo 6
Cr 11 = cromossomo 11
DF= doença falciforme
EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS= Óxido nítrico sintase endotelial
EROs= Espécies reativas de oxigênio
ERNs = Espécies reativas de nitrogênio
ET-1= endotelina 1
GMCSF = fator estimulante do crescimento neurocítico e granulocítico
GMPc= Monofosfato cíclico de guanosina
GPX = glutaciona peroxidase
GSSG = glutaciona dissulfeto
GSH = glutaciona reduzida
HAP= Hipertensão arterial pulmonar
Hb= Hemoglobina total
Hbsf = Hemoglobina S e F
HbAS= Heterozigose Hemoglobina S
HbC= Hemoglobina C
HbD= Hemoglobina D
HbF= Hemoglobina fetal
HBG= gene da hemoglobina
HbS=Hemoglobina S
HbSS= Homozigose da Hemoglobina S
Hemácia SS = hemácia falciforme em homozigose
HEME = anel porfirínico composto de um átomo de ferro ligado a quatro átomos de nitrogênio
HPLC = cromatografia líquido de alta "performance"
HU = hidroxúria
HS-40= região de controle 40
HUWC= Hospital Universitário Walter Cantídio
Ht= Hematócrito
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
ICAM= molécula de adesão intercelular
VCAM= molécula de adesão vascular
IL 1 = interleucina 1
IL 4 = interleucina 4

IL 8 = interleucina 8
IL 10 = interleucina 10
IL 12 = interleucina 12
IL 23 = interleucina 23
IL- 1 β = Interleucina -1 β
IL-6= Interleucina 6
IL-17= Interleucina 17
LACEN=Laboratório Central do Estado do Ceará
LDH= Lactato desidrogenase
LPHDGH= Laboratório de pesquisa em hemoglobinopatias e doenças genéticas hematológicas
MDA= Malonaldeído
MetHb= Metahemoglobina
mRNA = ácido ribonucleico mensageiro
NADPH= fosfato de nicotinamida adenina
NADPHoxidase= fosfato de nicotinamida adenina oxidase
NEED = etilenediamina
NF-k β = Fator nuclear kappa- β
NO= Óxido nítrico
NO_x= Nitrito
NOS= Óxido nítrico sintase
OR = *odds ratio*
OH = radical hidroxila
O₂ = ânion superóxido
PCR= Reação em cadeia polimerase
PS= Fosfatidilserina
QPCR = reação em cadeia polimerase em tempo real
RET= Reticulócitos
SCD= Anemia falciforme (*sickle cell disease*)
SOD= superóxido dismutase
SNPs= Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*)
STA= Síndrome torácica aguda
TBARS = ácido tiobarbitúrico
TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β = Fator transformador de crescimento beta
TSP = Trombospondina
Th1 = linfócitos T helper 1
Th2 = linfócitos T helper 2
Th17 = linfócitos T helper 17
TNF- α = fator de necrose tumoral alfa
XO= xantina oxidase
 α - Thal = alfa talassemia
 β - LCR= região de controle "locus" β
ICAM = Molécula de Adesão Intracelular
CD36= Receptores de Trombospondina
AVC=Acidente vascular cerebral

LISTA DE SÍMBOLOS

α = Alfa

β = Beta

δ = Delta

ε = Epsilon

γ = Gama

β - globina = beta globina

β^s = beta S

Fe^{2+} = ferro ferroso

Fe^{3+} = ferro férrico

$2\text{H}_2\text{O}$ = duas moléculas de água

H_2O = água

O_2 = Oxigênio

2p16.1= braço curto do cromossomo 2 , banda 16, região 1

SUMÁRIO

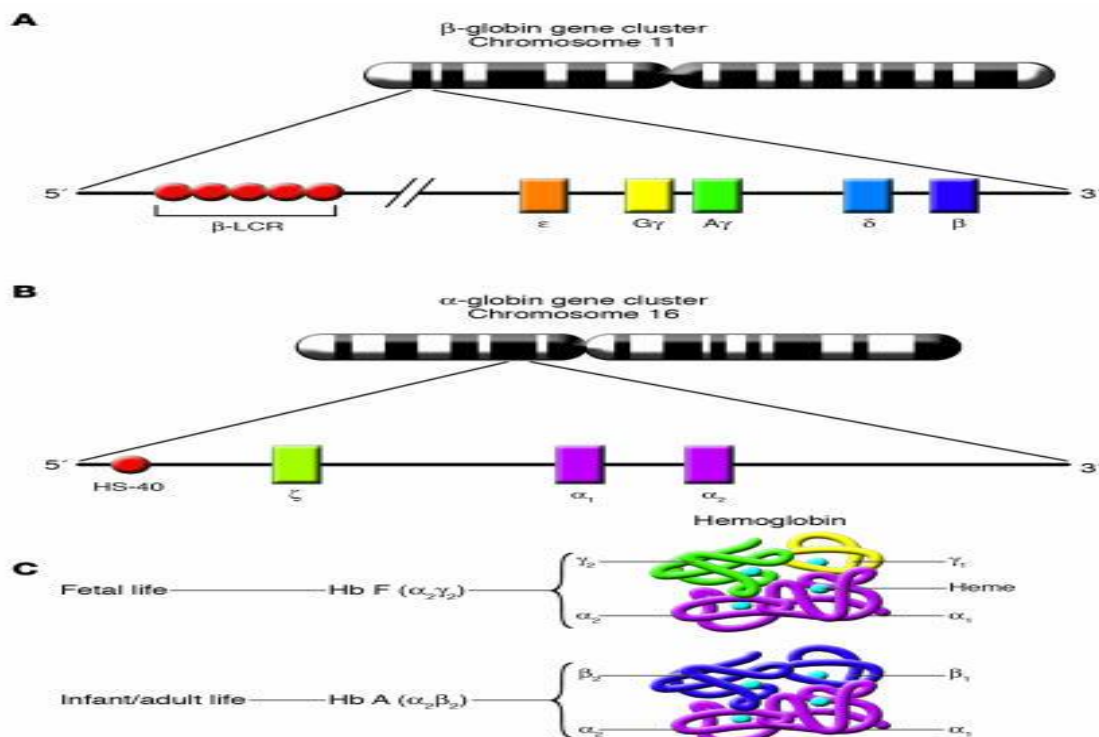
1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Anemia falciforme considerações	16
1.2	Fisiopatologia da Anemia falciforme	19
1.2.1	Hemólise na Anemia falciforme.....	22
1.2.2	Processo inflamatório na Anemia falciforme.....	24
1.2.3	Estresse oxidativo na Anemia Falciforme.....	26
1.3	Hemoglobina fetal e concentração de HbS como biomarcadores da clínica na Anemia Falciforme	30
1.4	Parâmetros laboratoriais hematológicos na Anemia Falciforme	32
1.5	Hidroxiuréia	33
1.6	Moduladores Genéticos na Anemia falciforme	34
2	OBJETIVO	39
2.1	Objetivo Geral	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	40
3.1	Casuística	40
3.2	Métodos	41
3.2.1	Coleta do material biológico.....	41
3.2.2	Testes hematológicos.....	42
3.2.3	Dosagem das citocinas.....	42
3.2.4	Determinação dos parâmetros de hemólise.....	42
3.2.5	Testes do estresse oxidativo.....	42
3.2.6	Determinação dos moduladores Genéticos.....	43
3.3	Aspectos Éticos	46
3.4	Análises Estatística	46
4	RESULTADOS	48
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	83
	ANEXO A - Termo de consentimento	84
	ANEXO B - Aprovação do comitê de ética	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia falciforme

A hemoglobina humana é uma molécula tetramérica, constituída por um átomo central um íon ferro num complexo denominado heme, e dois pares de subunidades polipeptídicas idênticas, as cadeias globínicas α_1 , α_2 , β_1 e β_2 , cada par codificado por um gene diferente: o agrupamento de genes da globina alfa (ζ , α_1 e α_2), localizado no cromossomo 16, e o agrupamento de genes da globina beta (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β), localizado no cromossomo 11. Curiosamente, os genes estão presentes, em ambos os cromossomos, na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento humano. No período da vida fetal, o tipo predominante de hemoglobina é a Fetal (Hb F- $\alpha_2\gamma_2$). (Figura 1). (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Figura 1. Representação dos cromossomos 11, 16 e das das moléculas de Hb F e A.

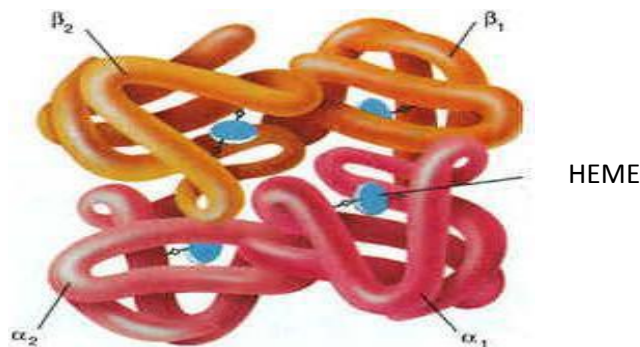


Fonte: FRENETTE; ATWEH, 2007.

Em A: representação do agrupamento de genes da globina beta (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β), localizado no cromossomo 11. B: o agrupamento de genes da globina alfa (ζ , α_1 e α_2), localizado no cromossomo 16 e C: molécula da hemoglobina Fetal (Hb F- $\alpha_2\gamma_2$) e a hemoglobina A (HbA- $\alpha_2\beta_2$) normal do adulto.

Durante o período pós-natal, a Hb F é gradualmente substituída pela hemoglobina A (HbA- $\alpha_2\beta_2$). A hemoglobina A2 (HbA- $\alpha_2\delta_2$) é um tipo minoritário de hemoglobina adulta, que representa menos de 2,5% da hemoglobina. A HbA ou HbA1 a partir do seis meses de vida, corresponde a hemoglobina predominante em média de 95 a 96%, constituída por duas cadeias α e duas β , quatro anéis tetrapirrólicos heme (Figura 2). Enquanto que a HbF varia de zero a 1%. (NAOUM, 2000).

Figura 2. Representação da molécula da hemoglobina normal do adulto formada pelas cadeias globínicas α_1 , α_2 , β_1 e β_2 e um anel tetrapirrólico heme, ao centro.



Fonte: SILVA *et al.*, 2006.

A AF é doença genética, recessiva e autossômica que cursa com anemia hemolítica crônica, causada por uma mutação pontual, onde ocorre a substituição da base nitrogenada adenina por timina (GAG→GTG), resultando na troca do ácido glutâmico por valina (REES *et al.*, 2010), no 6º aminoácido da cadeia β (beta), no gene da β globina que leva a modificação físico-química da molécula de hemoglobina (ADEKILE, 2013) e conseqüente alterações nas propriedades do tetrâmero da hemoglobina, que passa a apresentar o fenômeno de polimerização quando no estado desoxigenado (BALLAS, 2002). Essa mutação origina uma hemoglobina anormal denominada HbS, que substitui a hemoglobina normal, denominada HbA. O gene da hemoglobina S é semi-dominante e pode se manifestar em heterozigose (HbAS), portador ou traço falcêmico, que apresenta fenótipo assintomático, ou em homozigose (HbSS) que consiste na AF. A denominação de

Doenças Falciformes se refere ao grupo das duplas heterozigoses da HbS, tais como as hemoglobinas C (HbC), hemoglobina D (HbD) e ou talassemias (NAOUM, 2000).

As doenças falciformes têm uma distribuição ampla, abrangendo todos os continentes, principalmente África, América do Norte, América Latina e parte da Ásia. Conforme dados do Ministério da Saúde, as prevalências são diferentes nas regiões brasileiras e estimam a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS; mais de 8 mil afetados com a forma homozigótica (HbSS). A presença desta patologia nas Américas se deve a imigração de descendentes daquelas regiões. Quanto à etnia, a AF é característica dos negros, no entanto, devido a intensa miscigenação no nosso país, esse fenômeno não é observado (NAOUM, 2000). No Brasil, mais de 8.000 indivíduos são portadores de anemia falciforme (forma homozigota) e cerca de 2 milhões apresentam o traço falciforme. A origem da AF é africana e foi trazida à América pela imigração forçada dos escravos, entre o século XV e a metade do século XIX (PANTE-DE-SOUSA, 1998) observando-se maior frequência nos países colonizados por negros. Sua distribuição é heterogênea em nosso país, em virtude da miscigenação racial, sendo apontada pela literatura científica brasileira como grave problema de saúde pública. (NAOUM, 2000). Esta alteração genética originária do continente africano, possui uma prevalência do gene β^s variada nas diferentes regiões do Brasil, oscilando entre 1 e 2% na região sul e de 6 a 10% entre negros e pardos na região nordeste. Pinheiro *et al.* (2006) demonstraram em Fortaleza-Ceará, a prevalência de 4,1% de HbS, sendo 3,8% de recém-nascidos HbAS, heterozigotos, e 0,2% Hb SS, homozigotos. A AF é uma das hemoblobinopatias mais frequentes da humanidade e representa a doença hematológica hereditária mais prevalente na população brasileira, sendo mais frequente nas regiões onde a colonização por negros foi maior, como é o caso do Nordeste (NAOUM, 2000).

1.2 Fisiopatologia da anemia falciforme

A HbS presente na AF, quando em baixa tensão de oxigênio, sofre modificação conformacional de sua molécula, devido à interação de natureza hidrofóbica da valina com a fenilalanina da posição 85 e da leucina da posição 88, desencadeando a formação de polímeros (WOOD; GRANDER, 2007) de filamentos longos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central, rodeado de seis filamentos duplos de polímero, fenômeno conhecido como polimerização, alterando a estrutura físico-química da hemácia que toma uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice”, hemácias falcizadas ou drepanócitos. As alterações físico-químicas descritas pela polimerização deformam e enrijecem a membrana dessas hemácias (ZAGO; PINTO, 2007), ocorrendo perda de íons através da membrana celular como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular, desidratação celular e a formação de polímeros que levam a exposição de proteínas transmembrana, em especial a fosfatidilserina (PS), de dentro para fora da célula, expondo cargas negativas glicolípídicas que estimulam o aumento das moléculas de adesão do endotélio e contribuem para um estado pró-inflamatório (quimiotaxia de leucócitos, aumento das adesividades celulares do sangue, liberação de citocinas pró-inflamatórias, diminuição do fluxo sanguíneo, vaso-oclusão) e pró-trombótico (ativação do complemento e da cascata da coagulação) (Figura 3). (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007). As hemácias, após vários episódios de falcização, tornam-se irreversivelmente falcizadas e são destruídas, tanto do meio extravascular como intravascular, configurando o quadro de hemólise eritrocitária crônica e redução da sua sobrevivência média para cerca de dezessete dias (SILVA; SHIMAUTI, 2006). A cinética da falcização das hemácias falciformes é maior com o aumento do grau de desoxigenação da hemoglobina S (HbS), maior concentração intracelular de HbS e baixa concentração de hemoglobina F (HbF).

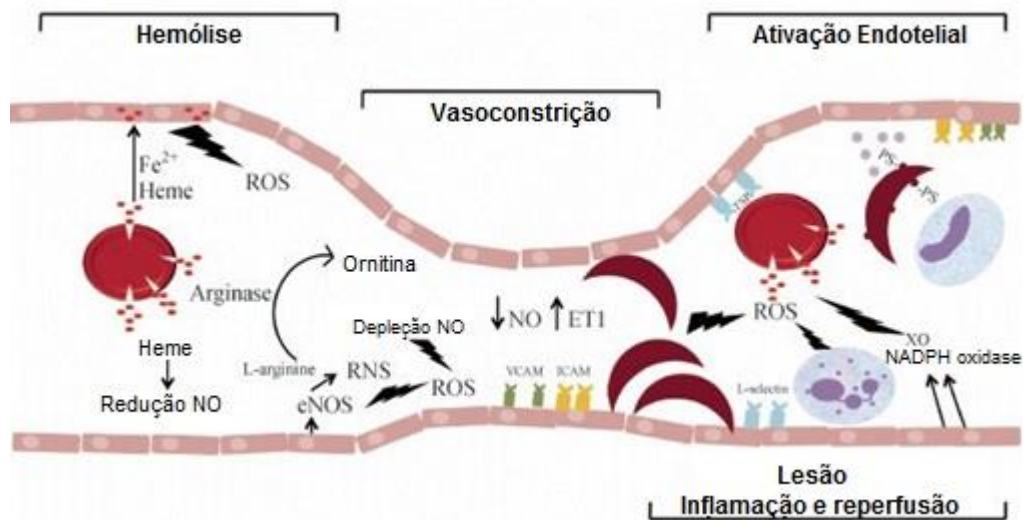
A hemácia falciforme consiste em uma célula com menor capacidade de deformabilidade ao passar dentro dos vasos (devido à presença de HbS intracelular que leva à polimerização da hemácia) e possui maior aderência ao endotélio vascular (mediada pelo complexo de integrina $\alpha_4\beta_1$, trombospondina, fator de von Willebrand e fibronectina), que favorece a formação de trombos na micro e macrocirculação, podendo comprometer o transporte de oxigênio, principalmente na microcirculação (FRENETTE; ATWEH, 2007). Essa aderência aumentada da

hemácia resulta no aumento da viscosidade citoplasmática, obstrução dos pequenos vasos e crises de vaso-oclusão, isquemia tecidual, episódios de dor e uma cascata dos eventos patológicos, que inclui disfunção endotelial, inflamação, hemólise, estresse oxidativo e injúria de reperfusão (FIGUEIREDO, 2007; ZAGO; PINTO, 2007; REES, GIBSON, 2011). Diante desse contexto, ocorrem lesões de órgãos alvos, associadas a elevadas taxas de morbimortalidade (WOOD; GRANDER, 2007). A vaso-oclusão na AF ocorre nos leitos capilares, de um menor calibre, maior lentidão do fluxo sanguíneo e maior desoxigenação da HbS. O mecanismo inicial destas crises vaso-oclusivas é controverso e multifatorial. Como a aderência dos eritrócitos ao endotélio vascular pode impedir o fluxo de sangue e aumentar mais ainda o tempo de trânsito nos capilares, sugere-se que o aumento da adesão celular possa ser o início da deflagração e propagação do fenômeno de vaso-oclusão. A rigidez destas hemácias deformadas contribui para oclusão vascular constituindo a maior causa de morbidade da doença (PLATT *et al.*, 1994; HEBBEL, 1997; PARISE, 2007). Outros fatores, como as proteínas plasmáticas, citocinas, plaquetas, eritrócitos falcizados, anormalidades endoteliais e a quimiotaxia dos leucócitos, estão envolvidos no fenômeno de vaso-oclusão, sendo importante o papel dos leucócitos e a leucocitose associada com o aumento do índice de morte prematura, STA e AVC em crianças com AF (PLATT *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000). A maior adesão ao endotélio leucocitária contribui com o microambiente inflamatório que se instala nos pacientes com AF. Durante o fluxo sanguíneo, os eritrócitos circulantes podem interagir com os leucócitos aderidos, sofrer desoxigenação e posterior falcização (FRENETTE; ATWEH, 2007).

O somatório de todos esses eventos atuam como moduladores do fenômeno obstrutivo vascular característico da doença. O fenômeno de falcização da hemácia SS promove o contato direto delas com o endotélio gerando hemólise, liberação de dímeros de hemoglobina, os quais consomem o óxido nítrico (vasodilatador) e causam ativação do endotélio com aumento das expressões das moléculas de adesão, tais como ICAM, VCAM, P-selectinas e as L-selectinas que recrutam leucócitos e trombospondina (TSP), os quais aderem reticulócitos via CD36 e aumentam a liberação de endotelina-1 (vasoconstrictor) pelas células endoteliais, desregulando a produção destas substâncias vaso-reguladoras resultando em vasoconstricção e vasculopatia. Estes eventos desencadeiam um estado pró-

inflamatório crônico, manifestado por adesão de células vermelhas, adesão leucocitária e agregação plaquetária culminando com a oclusão do vaso (Figura 3).

Figura 3 . Mecanismos patofisiológicos na anemia falciforme (AF).



Fonte: OWUSU-ANSAH *et al.*, 2015

Nota: A figura mostra os processos hemolíticos, inflamatórios que vão desencadear dano endotelial e injúria de reperfusão, contribuindo com a vasoconstrição. Como a hemólise, a vasoconstrição, a inflamação e a isquemia reperfusão interagem para criar um estado de estresse oxidativo na AF. Como subprodutos de hemólise, a arginase e heme livres são liberados a partir de células vermelhas e, posteriormente, difundem para as células vizinhas, levando a depósitos de ferro que catalisam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A vasoconstrição ocorre quando a endotelina-1, um vasoconstritor que se opõe aos efeitos vasodilatadores do NO é liberada. O efeito inibidor do NO sobre a inflamação é perdido e a ativação endotelial leva a expressão de moléculas de adesão tais como ICAM, VCAM, P-selectinas e as L-selectinas que recrutam leucócitos e trombospondina (TSP), ao qual aderem reticulócitos via CD36. Hemácias falciformes expressam fosfatidilserina exteriorizada em suas membranas causando a ativação plaquetária e são fagocitados pelos macrófagos que contribuem ainda mais para a hemólise. A xantina oxidase (XO), que tem seus níveis elevados durante a lesão de reperfusão, aumentam a produção de EROS.

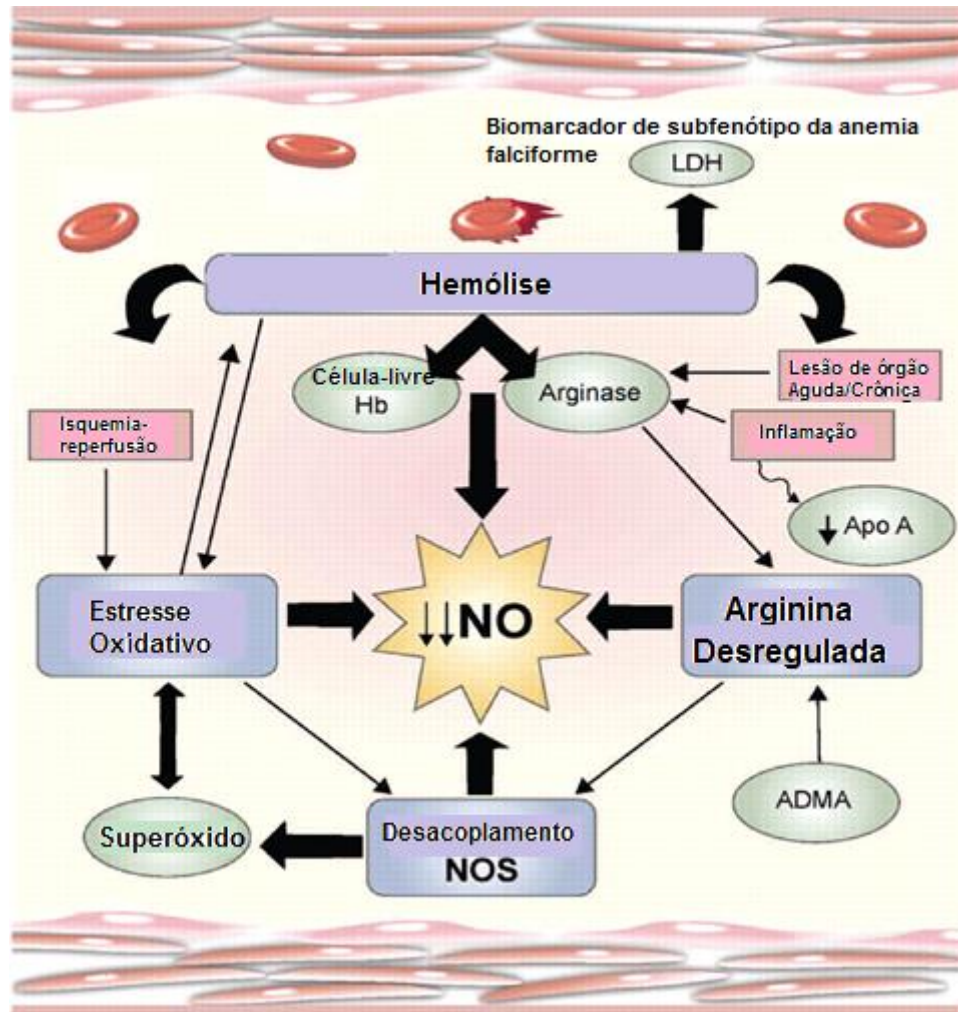
1.2.1 Hemólise na anemia falciforme

A presença de hemólise constitui um paradigma na AF. A hemólise tem um papel fundamental na fisiopatologia da AF e ocorre por dois mecanismos: a extravascular, através das células reticuloendoteliais do baço que reconhecem as hemácias falcizadas como estranhas, (GALILI *et al*, 1986) e intravascular, quando os eritrócitos falcizados, por apresentarem exposição da fosfatidilserina, tornam-se mais eletronegativos e adquirem maior capacidade de adesão ao endotélio vascular, resultando em hemólise e liberação de metemoglobina (MetHb), do radical heme, os quais se ligam à haptoglobina (complexo endocitado pelo macrófago) e hemopexina (complexo degradado pelos hepatócitos do fígado), respectivamente e libera arginase, a qual diminui a L-arginina, substrato utilizado para a produção de óxido nítrico (NO), que associado a liberação de hemoglobina livre vão desencadear uma diminuição na biodisponibilidade de NO associado a geração EROs. A diminuição da biodisponibilidade do NO, vasodilatador, juntamente com o aumento da produção endotelina-1 (ET-1) pelo endotélio, desencadeiam a vasoconstrição (ZAGO; PINTO, 2007; PASSOS *et al.*, 2010), aumentando mais ainda o fenômeno de vaso-oclusão). O processo inflamatório crônica na doença, também contribui para gerar o estresse oxidativo. Todos esses fatores contribuem para a isquemia de reperfusão, característica da doença (Figura 4).

Diariamente, pela hemólise intravascular, 10% dos eritrócitos hemossilam 30g de hemoglobina é liberada no plasma (REITER, 2002). O excesso de hemólise intravascular leva a saturação dos mecanismos de remoção da MetHb e do heme, os quais livres no plasma, geram um estado pró- inflamatório e pró -oxidante causando disfunção da célula endotelial (FRENETTE; ATWEH, 2007). Os eritrócitos falcêmicos, no estado basal, têm a sobrevida média encurtada para 35,4 dias, que diminui para 16,6 dias durante as crises vaso-oclusivas (BALLAS; MARCOLINA, 2006). Estes fenômenos ocorrem durante o fluxo sanguíneo dos eritrócitos falcêmicos através dos capilares os quais são sequestrados na porção venosa da microcirculação (MORANDAS *et al*, 1986; WU; MORRIS, 1998; TANGPHAO, *et al* 1999; BOGER and BODE, 2000). As hemácias que sofreram polimerização da HbS formam tampões entre si os quais são sequestrados na microcirculação, desencadeando hemólise, vaso-oclusão e isquemia tecidual. Os fenômenos de polimerização da HbS e hemólise promovem uma cascata de eventos que provocam vasoconstrição, lesão de isquemia/reperfusão, produção de radicais livres de

oxigênio, inflamação local e sistêmica, resultando em disfunção endotelial com secreção de endotelina-1, mais consumo de NO, ativação de moléculas de adesão, e ativação da coagulação (RAGHAVACHARI *et al*, 2007) e consequente lesão tecidual aguda e crônica (WOOD ; GRANGER, 2007). Este estado de deficiência relativa de NO e disfunção endotelial na circulação pulmonar resultam em vasoconstrição e remodelamento vascular (XU *et al*, 2004), estando relacionados ao desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar (HAP) (TUDER *et al*, 2001; BUDHIRAJA *et al*, 2004). Este fato também foi constatado em camundongos transgênicos com Doença Falciforme (DF) (KAUL *et al*, 2008) e em outras doenças hemolíticas crônicas, como β Talassemia, esferocitose congênita, hemoglobinúria paroxística noturna e anemia hemolítica microangiopática (LIN *et al*, 2005; MORRIS *et al*, 2005). A HAP que ocorre nas colagenoses possui a mesma patogenia (XU *et al*, 2004). Algumas complicações da anemia falciforme ocorrem com mais frequência em pacientes com altos índices de hemólise (KATO *et al*, 2007; TAYLOR *et al*, 2008). A presença e grau da hemólise podem ser avaliados pela contagem de reticulócitos, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e níveis de bilirrubina, os quais são rotineiramente medidos, embora nenhum seja específico para a hemólise (KATO *et al*, 2007; HEBBEL, 2011).

Figura 4. Mecanismos envolvidos na vasculopatia e hemólise na anemia falciforme.



Fonte: MORRIS, 2011.

Nota: A hemólise vai desencadear a diminuição da biodisponibilidade de NO, através de varias vias, contribuindo para a manutenção dos processos inflamatório e estresse oxidativo. Ciclo que vai proporcionar as frequentes isquemias reperfusão, característica da doença. A desregulação da arginina, o estresse oxidativo e o desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) são mecanismos essenciais que contribuem para a fisiopatologia vascular na anemia falciforme (AF). Estes eventos limitam a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) através de vários caminhos que, finalmente, culminam no aumento do consumo e diminuição da produção desse potente vasodilatador, contribuindo para os processos vaso-oclusivos.

1.2.2 Processo inflamatório na anemia falciforme

A inflamação crônica na AF é desencadeada por repetidos episódios de hemólise resultando em crises de vaso-oclusão e leucocitose, com ativação dos leucócitos. Os leucócitos, principais moduladores do processo inflamatório, quando

ativados, promovem a liberação dos mediadores pró-inflamatórios, como a interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF- α) dos macrófagos teciduais, que ativam o endotélio e aumentam a expressão das moléculas de adesão, que passam a ser receptores de leucócitos, contribuindo assim para o bloqueio do fluxo sanguíneo (ASLAN; CANATAN, 2008). Ao ocorrer a quimiotaxia dos leucócitos, a leucocitose resultante promove agregação de outras células sanguíneas, aumento da expressão endotelial das moléculas de adesão, dano e injúria tecidual exarcebando ainda mais o processo inflamatório local (CONRAN; COSTA, 2009). As células endoteliais promovem a síntese do NO, além da produção de outros vasodilatadores como as prostaciclina, bem como a produção de substâncias vasoconstritoras incluindo a endotelina, a angiotensina II e prostaglandinas. Os pacientes portadores de AF apresentam um desequilíbrio entre a produção e consumo destas substâncias vaso reguladoras (GALLEY; WEBSTER, 2004). Além disso, ocorre maior contato das hemácias em foice com o endotélio, a maior produção de espécies reativas de oxigênio e hemólise crônica. Uma vez ativadas, células endoteliais promovem a liberação de fatores vasoconstritores, fatores pró-coagulantes, com uma expressão aumentada de moléculas inflamatórias, que desencadeiam processos inflamatórios, adesão celular, ativação da coagulação e estresse oxidativo culminando com disfunção e ativação endotelial e com o estado inflamatório crônico (CONRAN; COSTA, 2009). As citocinas, IL-4, IL-10, IL-17 e TGF- β , também, estão implicadas ao processo inflamatório crônico da AF, as células endoteliais dos vasos comprometidas, que estimulam o fator nuclear kappa- β (NF- $\kappa\beta$) das células contribuindo para a manutenção do processo inflamatório (THASSILA *et al.*, 2013). A IL-6 desencadeia uma variedade de funções na célula, incluindo a diferenciação, maturação, proliferação e maior sobrevivência celular. Estudos têm comprovado um aumento da IL-6 em pacientes com AF quando comparado ao grupo de indivíduos normais. O aumento da IL-6 é maior ainda em pacientes com AF em crise do que no período de estado basal (THASSILA *et al.*, 2013). A IL-17 é produzida por um subtipo de linfócitos T, denominado de linfócitos T helper 17 (Th17), que é diferente dos linfócitos Th1 e Th2. A diferenciação de células *naive* (linfócitos que não tiveram contato com antígenos) para células Th17 requer a presença do fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e subsequente expansão da resposta Th17 requer também a IL-23 (THASSILA *et al.*, 2013). A função da IL-17 e do TGF- β na AF ainda não está totalmente documentada.

Keikhaei *et al.*, (2013) recentemente observou aumento da IL-17 e TGF- β em pacientes com AF em relação a pessoas não portadoras de AF. Porém, não houve diferença significativa nos níveis dessas citocinas entre os pacientes com AF em estado basal e em crise. Os pacientes em uso de HU apresentaram valores inferiores em relação aos que não se encontravam em uso. Vilas-Boas *et al.*, (2010) demonstraram uma correlação positiva entre a arginase sérica e o TGF- β em pacientes com AF, achados que fortalecem a hipótese de que o TGF- β induz uma regulação positiva do mecanismo da arginase e uma regulação negativa no mecanismo de produção do NO. A IL-10 consiste em uma citocina anti-inflamatória cujo principal efeito é a inibição da síntese de várias citocinas, tais como o TNF- α ; GM-CSF; IL-1; IL-6; IL-8 e IL-12, para promover a captação e retenção de ferro no interior dos macrófagos e do sistema retículo endotelial. A IL-10 inibe a proliferação das células Th1, resposta celular pró-inflamatória, facilitando o desenvolvimento da resposta Th2, resposta anti-inflamatória. Lanaro (2009) verificou aumento da IL-10 em pacientes com AF em uso de HU, porém o mecanismo não foi descrito. A leucocitose constitui um fator de risco da gravidade da doença com aumento da ocorrência de síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC) e de óbito em crianças com AF (PLATT *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 2000).

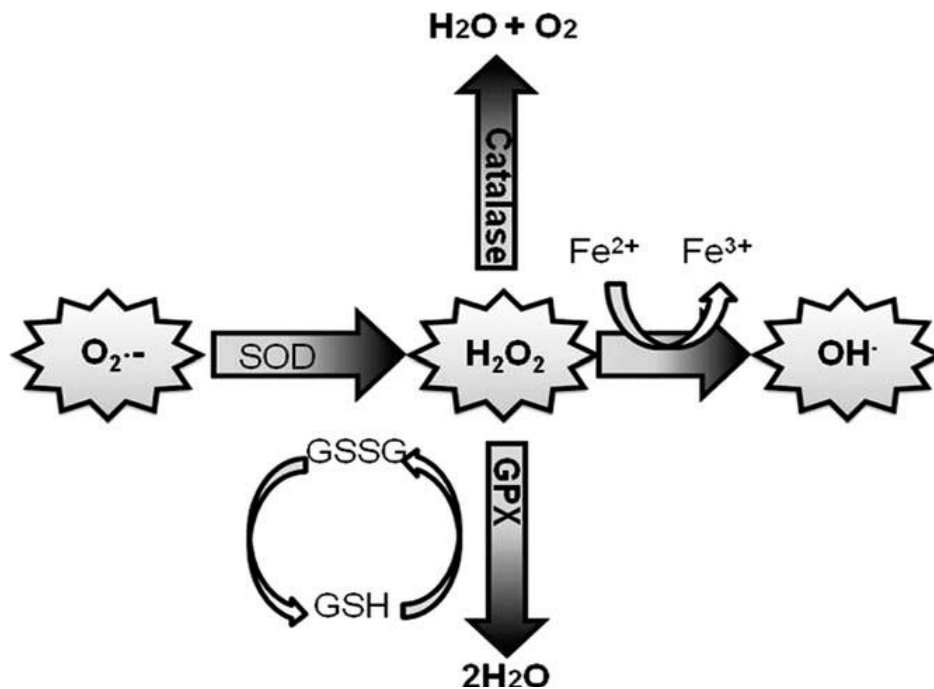
1.2.3 Estresse oxidativo na anemia falciforme

A molécula de oxigênio tem grande habilidade de originar metabólitos reativos tais como os radicais ânio superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-). Esses metabólitos do oxigênio reduzidos são denominados de "espécies reativas de oxigênio" (ROS) (Fig. 1). As ROS podem induzir lesões oxidativas que causam dano à célula e formam uma estrutura muito estável através da extração de elétrons a partir de outras fontes. Também ROS são capazes de gerar outras formas de ROS. O superóxido (O_2^-) pode ser transformado em H_2O_2 e oxigênio. O H_2O_2 e radical OH^- têm a capacidade para formar ainda mais lesão, através da combinação das reações de Haber-Weiss e Fenton (KOHEN; NYSKA, 2002). A inibição da atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial pode levar a geração de ROS através da indução da perda de elétrons do complexo I (PRABHAKAR, *et al.*, 2007). Geração de ROS também pode resultar a partir da

ativação de enzimas, tais como a xantina oxidase (XO), Oxidase NADPH, óxido nítrico sintase (NOS), no citocromo das células falciformes.

A polimerização da HbS intracelular durante a desoxigenação é o evento patogênico primário na AF. A taxa de polimerização, demonstrada “in vitro”, foi correlacionada com a concentração de HbS e com o heme livre de célula libertado após a auto-oxidação (BUNN *et al.*, 1982; UZUNOVA *et al.*, 2010). A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido atribuída à auto-oxidação da hemoglobina S (HbSS) e às reações químicas catalisadas por fragmentos desnaturados do grupo heme ligados à membrana da hemácia (BROWNE; SHALEV; HEBBEL, 1998). A fase de reoxigenação da hemoglobina S é uma importante fonte de produção de radicais livres na AF. Durante este período, os glóbulos vermelhos podem gerar uma quantidade significativa de superóxido devido a um transferência de elétrons entre o ferro heme e oxigênio. Na presença de oxigênio, o heme se auto-oxida induzindo a formação de metemoglobina e superóxido. A HbS pode tornar-se sobregarregada pela fonte contínua de superóxido e, através da sua dismutação, H_2O_2 (ASLAN *et al.*, 2000). A formação de H_2O_2 , quando expostos a metemoglobina, a hemoglobina se decompõe e libera ferro. Este ferro pode então reagir com H_2O_2 remanescente para produzir mais OH^\cdot , o mais reativo e prejudicial das espécies reativas de oxigênio (ASLAN *et al.*, 2000). Hemácias falciformes acabarão por gerar, cerca de duas vezes, maiores quantidades de superóxido, H_2O_2 , e OH^\cdot do que a HbA (AMER *et al.*, 2006).

Figura 5. Equilíbrio entre ROS e antioxidantes. No estresse oxidativo ocorre um desequilíbrio entre a produção de ROS e antioxidantes. As propriedades antioxidantes GPX, SOD, catalase e o controle pela da produção das espécies de oxigênio. Abreviações: GPX, glutathione peroxidase; GSH, glutathione reduzida; GSSG, glutathione disulfide; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; O_2^- , superóxido; OH^\cdot , radical hidroxila; ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase.



Fonte: KOHEN; NYSKA, 2002

Os agentes anti-oxidantes na AF, em relação aos mecanismos de proteção ao estresse oxidativo, estão diminuídos. Aqueles que fornecem defesa enzimática, incluindo SOD, GPX, catalase, e heme oxigenase-1, e aqueles que removem os radicais, tais como a glutathiona, a vitamina C e vitamina E, são os mais afetados (NATTA *et al.*, 1990). Na AF, alguns estudos têm demonstrado aumento da SOD (DAS; NAIR, 1980; MANFREDINI *et al.*, 2008), enquanto outros mostram diminuição dos níveis (SCHACTER *et al.*, 1988; DASGUPTA *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Das e Nair demonstraram um aumento da SOD em hemácias de pacientes com AF, concluindo que este pode ser uma mecanismo de defesa, devido ao aumento do estresse oxidativo e poderia possivelmente causado por um acúmulo de H_2O_2 . Um estudo, em contrapartida, de Schacter *et al.* (1988) mostrou que os níveis de SOD estão diminuídos em proporção da gravidade da doença em pacientes com HbS em comparação com voluntários saudáveis pretos. Essa diferença foi sugerida ser devido a uma mais rápida degradação de SOD, possivelmente a partir de radicais de oxigênio. Eles também mostraram que os controles negros têm naturalmente um maior nível de SOD do que os controles brancos; o que significa que a principal discrepância entre os estudos poderiam

estar no controle utilizado (SCHACTER *et al.*, 1988). O sistema antioxidante atua inibindo ou reduzindo os danos causados às células pelas espécies reativas do oxigênio (EROS). As principais enzimas envolvidas são a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) e superóxido desmutase (SOD). A catalase promove a desmutação do H_2O_2 , formado ao final da cadeia de transporte de elétrons, em H_2O e O_2 (DAVID, *et al.*, 2006).

Existem vários mecanismos envolvidos no aumento do estresse oxidativo em pacientes com AF. A hemoglobina e o grupo heme livres, resultantes da hemólise crônica, geram radicais superóxido através do mesmo mecanismo não enzimático (KRAJEWSKI; HSU; GLADWIN, 2008). Em pacientes em regimes de transfusão crônica, o acúmulo de ferro livre nos hepatócitos e outros tipos de células também pode contribuir para o estresse oxidativo. Os ciclos repetidos de isquemia tecidual e reperfusão resultam na liberação de xantina oxidase (XO) dos hepatócitos e outros tecidos (ASLAN; CANATAN, 2008). A arginase liberada no plasma, a partir de hemácias lisadas, bem como a arginase de células endoteliais, induzidas e ativadas por sinais pró-inflamatórios, depletam o substrato da óxido nítrico sintase (NOS), a arginina, o que resulta na produção de ROS e na redução da biodisponibilidade do NO, potente vasodilatador (MORRIS *et al.*, 2005; WOOD; HSU; GLADWIN, 2008). Pacientes com AF apresentam estresse oxidativo constante, que é decorrente da deficiência nos sistemas antioxidantes, caracterizados pela produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) de origem multifatorial, principalmente geradas pela presença do processo hemolítico. Dentre as etiologias de estresse oxidativo estão os eventos de vaso-oclusão com isquemia e reperfusão, os quais são muito frequentes. Os estudos indicam que o estresse oxidativo parece contribuir para a patofisiologia da AF. Os lipídeos são a classe de moléculas mais susceptível à reação de oxidação, pela ação das espécies reativas de oxigênio. A destruição dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como o malonaldeído (MDA) e outros aldeídos são especialmente danosos, reduzindo a viabilidade das células (DAVID, *et al.*, 2006). O estresse oxidativo também danifica as proteínas do citoesqueleto, podendo resultar em lesões irreversíveis nas hemácias e hemólise. Os eritrócitos falcizados possuem aumento da permeabilidade de membrana, perdem potássio, têm aumento do influxo de cálcio intracelular tornando-se mais densos, os canais de Gardos são ativados, causando desidratação

da célula e intensificação da falcização (EATON *et al.*, 1973; PALEK *et al.*, 1977 ; LUTHRA; SEARS, 1982; MOHANDAS *et al.*, 1986).

A doença tem sido associada com os processos biológicos, tais como inflamação, vasculopatia, hemólise, infecção, vaso-oclusão e lesão de isquemia e reperfusão (NUR *et al.*, 2011). A oxidação é parte fundamental do metabolismo de organismos aeróbicos. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições tanto fisiológicas como em várias patologias (DAVID, *et al.*, 2006).

Esta doença é uma condição inflamatória crônica que diminui as reservas de óxido nítrico (NO). NO é normalmente produzido pelo endotélio e regula o tom vaso basal, inibe a ativação de plaquetas e hemostático, inibe a moléculas de adesão e reduz os níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS). A importância potencial do NO na AF tem sido objeto de muitas pesquisas na última década. Aceita-se agora que a diminuição da disponibilidade de NO é um mecanismo importante na fisiopatologia da doença (GONÇALVES, 2012).

1.3 Hemoglobina fetal e concentração de hbs como biomarcadores da clínica na anemia falciforme

A hemoglobina fetal (HbF) encontra-se no sangue de um indivíduo saudável, com idade superior a seis meses, na faixa de 1% a 2% e está restrita a poucos eritrócitos identificados como células- F. Em torno de 3% a 7% dos eritrócitos contêm HbF e, cada um deles tem 4 a 8 picogramas (pg) de HbF juntamente com 22 a 26 pg de HbA. O número de células-F de um indivíduo está sob controle genético (NAOUM, 2000). Mostrou-se clinicamente que as células contendo HbF sobrevivem mais tempo do que as células com HbS (CHARACHE, 1990). A síntese da γ e, portanto, da própria HbF, também pode ser estimulada por fatores externos como as leucemias, transplantes de medula óssea e induções químicas, dentre outras (SHIMIZU, 1988; NAGEL, 1989).

A hemoglobina fetal consiste num dos principais biomarcadores relacionados à expressão clínica da AF (CARDOSO, 2005; TAKAHASHI, 2005) e também nos

valores hematimétricos laboratoriais (CHARACHE, 1992). Os níveis de HbF apresentam-se diferentes entre os pacientes com AF. Sabe-se que os níveis de HbF têm influência nas manifestações clínicas da AF e de outras hemoblobinopatias, devido ser uma hemoglobina que possui maior afinidade pelo oxigênio, resultando na melhora dos sintomas da doença (LABIE, 1985; SHIMIZU, 1988; ZAMARO, 2003) e por ser capaz de diminuir as concentrações intracelulares de HbS que acabará por ditar o ritmo e a extensão de polimerização, fundamental na fisiopatologia da AF (AKINSHEYE *et al.*, 2011). Portanto, um percentual elevado de HbF tem sido significativamente associado com poucos eventos de vaso-oclusão (PLATT, 1991), poucos episódios de sequestro esplênico, reduzida mortalidade precoce (LEIKIN, 1989; PLATT, 1994), além de reduzir o número de transfusões e hospitalizações (CHARACHE, 1992). Ademais, níveis elevados de HbF demonstraram evitar este processo (FRANCO *et al.*, 2006; LANZKRON *et al.*, 2008). Portanto, a incapacidade de polimerização da HbS, devido a presença elevada da HbF, pode ser considerada como o regulador fundamental das apresentações clínicas e hematológicas diferentes nos pacientes com AF (REES ; GIBSON, 2012). Além disso, Sebastiani *et al.* definiu o fenótipo " HbSF " como pacientes com AF com a concentração de HbF de 10% ou mais e que estão com idade acima de quatro anos, idade em que os níveis de HbF torna-se estável (SEBASTIANI *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas da AF ocorrem geralmente nos primeiros seis meses e permanecem durante toda a vida do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE; LOUREIRO, 2005). O problema clínico mais freqüente é a crise dolorosa vaso-oclusiva. Existe grande heterogeneidade na apresentação clínica e diferentes complicações durante a evolução dos pacientes com AF, tais como a síndrome torácica aguda, doença cerebrovascular, insuficiência renal e óbitos precoces (PLATT *et al.*, 1994). Priapismo, vasculopatia, dentre outras, têm sido utilizadas como subfenótipos em estudos de associação genética revisto em Steinberg & Sebastiani, 2012. Encontramos ainda, na evolução clínica, a presença de infecções recorrentes, enfartes pulmonares, retardo do crescimento e da maturação sexual, úlceras de membros inferiores, sequestro esplênico, necrose asséptica da cabeça do fêmur, retinopatia, autoesplenectomia e outras, como consequência do processo inflamatório crônico generalizado, crises de hemólises, aumento do estresse oxidativo, vaso-oclusão e isquemia tecidual. Os fenômenos de vaso-oclusão, a partir

de eritrócitos falcizados, são a característica marcante da AF e resultam em disfunção orgânica (STEINBERG, 2009).

Essa marca da variabilidade clínica na AF ocorre pela complexidade de sua fisiopatologia que, além da inflamatória, muitos outros fatores estão envolvidos, como os genéticos, modificando o curso da doença. Enquanto Hb F e um traço coexistentes α -Thal são reconhecidos como os principais fatores de boa evolução, vários polimorfismos de nucleotídeo único em locos gênicos, tanto dentro do grupamento de genes da β globina, no cromossoma 11, como em outros cromossomas, cada vez mais identificados, especialmente com recentes estudos de associação do genoma (STEINBERG, 2012). No entanto, não parece que estes mecanismos genéticos explicam completamente a diversidade fenotípica da doença. Epigenética e mecanismos ambientais são muito importantes e merecem mais estudos coordenados (ADEKILE, 2013).

1.4 Parâmetros laboratoriais hematológicos na anemia falciforme

Os biomarcadores do sangue têm sido úteis na identificação de diferentes mecanismos causadores da doença e estão associados ao estado de hipercoagulabilidade, inflamação, hemólise, estresse oxidativo, vasculopatia, lesão de reperfusão e as respostas vasodilatadoras reduzidos do endotélio encontrados e que estão associados à manifestação clínica e identificação de sub-fenótipos da AF. A definição de biomarcador consiste em um indicador biológico, que é objetivamente medido e avaliado, dos processos biológicos normais ou patológicos ou de respostas farmacológicas para uma terapêutica ou intervenção (DAMANHOURI *et al.*, 2015).

A concentração de hemoglobina baixa é o biomarcador mais útil, isoladamente, na AF. Está geralmente associada com resultados clínicos futuros imprevisíveis da AF (KATO *et al.*, 2006) refletindo maior risco de problemas como o AVC, quer devido à hemorragia ou infarto cerebral (GUEGUEN *et al.*, 2014), morte prematura (ANDEMARIAM *et al.*, 2014), exame de Doppler transcraniana anormal (REES *et al.*, 2008) e de regurgitação tricúspide alta (GLADWIN *et al.*, 2004). A contagem de glóbulos brancos (leucócitos totais) encontra-se anormalmente elevada

na AF e ocorre devido ao hipoesplenismo ou asplenismo e inflamação crônica característicos da doença, podendo ser um dado de prognóstico para as condições de gravidade clínica, tais como infartos cerebrais, síndrome torácica aguda e morte (CHARACHE, 1997). Todos os componentes celulares do sistema de sangue estão ativados na AF (BELCHER *et al.*, 2000; LAURANCE, *et al.*, 2010). As plaquetas desempenham um papel crucial na patogênese de complicações ateroscleróticas, contribuindo para formação de trombos ou placas, após ativadas, durante as crises na AF (KARIO *et al.*, 1992; GREISENEGGER *et al.*, 2004).

1.5 Hidroxiuréia

A HU é a única droga utilizada no tratamento da AF. É um agente citotóxico, recombinogênico e antineoplásico. Seu uso na AF deve-se ao aumento da concentração de HbF, da hemoglobina total e redução da hemólise. A HU atua também na redução da expressão de moléculas de adesão, com propriedades anti-inflamatórias e anti-agregante, contribuindo para a diminuição das crises vasooclusivas, reduzindo a necessidade de transfusões sanguíneas, a frequência de hospitalizações e a mortalidade (STROUSE, 2008). Estudos atribuem ainda à droga uma ação no metabolismo do NO, aumentando a produção do mesmo, via ciclo da GMPc e conseqüentemente aumento da HbF (HUANG; KIM-SHAPIRO; KING, 2004). A terapia com HU aumenta a utilização do substrato arginina, para produção de NO pela atividade de NOS (NAHAVANDI *et al.*, 2000).

Embora o mecanismo dos processos que influenciam a polimerização da HbS estejam bem caracterizados, a explicação para a heterogeneidade fenotípica e a ampla variabilidade clínica da doença falciforme, assim como o perfil de resposta ao medicamento a HU ainda não está bem elucidado.

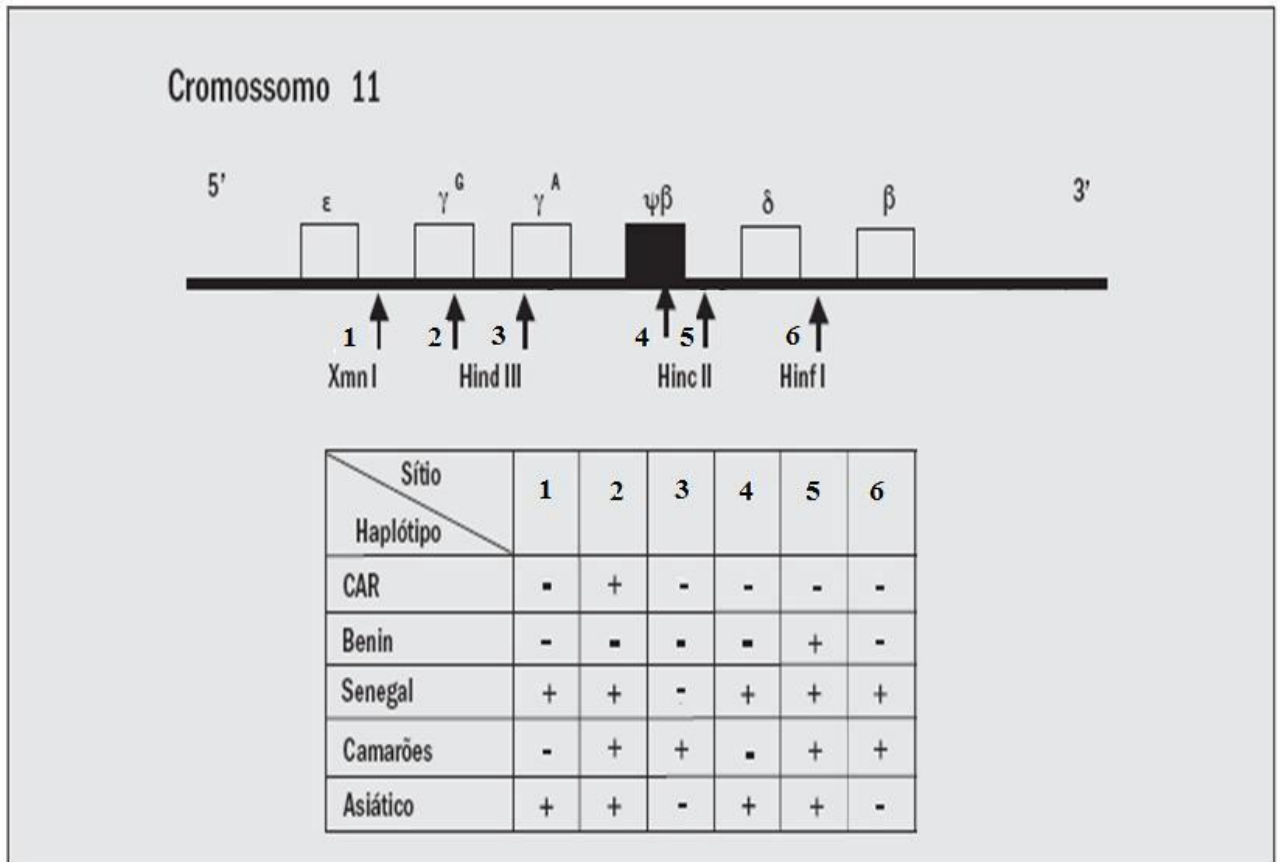
A hidroxiuréia (HU) é um fármaco utilizado no tratamento de doenças mieloproliferativas e da AF. Na AF, a HU age aumentando os níveis de hemoglobina fetal (HbF), reduzindo portanto a polimerização da HbS, e o fenômeno vasooclusivo.

1.6 Moduladores genéticos na anemia falciforme

Alguns fatores como a concentração de HbF, os haplótipos associados ao gene da beta-globina, o uso de hidroxiuréia e a presença dos polimorfismos como o *BCL11A* e *HBS1L-MYB* estão associados à expressão de HbF e também podem modular a clínica apresentada pelos pacientes com AF. Tem sido verificado que, na maior parte dos casos, a HbF elevada tem um efeito benéfico nos pacientes drepanocíticos devido esta hemoglobina diminuir a polimerização da HbS, além de diluir a concentração desta, diminuindo a hemólise provocada pela presença da HbS, atenuando os sintomas da doença (LETTRE *et al.*, 2008; SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009; SILVA; GONÇALVES; MARTINS, 2009).

Os haplótipos da β -globina são padrões de polimorfismos (polimorfismos de nucleotídeos simples) do DNA, no grupamento gênico da β -globina, localizados no cromossomo 11 de pessoas portadores do gene β^s . Os diferentes haplótipos são geralmente reconhecidos por um conjunto de perfis polimórficos de enzimas de restrição da região que constitui o aglomerado de genes da β -globina e foram nomeados conforme as regiões geográficas ou grupos étnicos em que o haplotipo β^s foi encontrado (ANTONARAKIS *et al.*, 1984; PAGNIER *et al.*, 1984; NAGEL *et al.*, 1985; KULOZIK *et al.*, 1986; LAPOUMÉROULIE *et al.*, 1992). Os haplótipos foram classificados em: Benin, originário da África ocidental; Bantu (ou Central Africano República), proveniente da África oriental e centro-sul; Senegal, oriundo da África atlântico-ocidental; Árabe-Indiano, encontrado na Índia e Península Arábica e Camarões localizado na costa Africana ocidental (NAGEL *et al.*, 1985). (Figura 6). Os polimorfismos SNPs possuem influência reguladora nos genes da β^s globina, alteraram a concentração da HbF ($\alpha_2\gamma_2$) (STEINBERG, 2006) e, além do interesse antropológico, também têm sido considerados como marcadores genéticos para explicar as diferenças tanto na expressão clínica da anemia falciforme como na resposta à droga (NAGEL *et al.*, 1985).

Figura 6 - Principais haplótipos do “cluster” gênico da β -globina.



Abreviatura: CAR=Bantu

Fonte: NAGEL *et al.*, 1985.

Estudos genômicos tem revelado a presença de diferentes prevalências de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) localizados no *loci* de *BCL11A* e *HBS1L-MYB* relacionados à variações da expressão de HbF, o que sugere que diversos genes e suas combinações sejam responsáveis pelas variações fenotípicas da AF (FIGUEIREDO, 2007; LETTRE *et al.*, 2008; FERREIRA, 2011). O gene *BCL11A* tem sido associado como o principal agente repressor dos genes HBG (gene globínico fetal), sendo demonstrado que eritrócitos adultos com níveis elevados de HbF apresentam redução da expressão de mRNA do *BCL11A*. Os mecanismos moleculares envolvidos nessa regulação ainda não foram completamente elucidados, entretanto, acredita-se que a proteína *BCL11A* se ligaria a um sítio específico localizado próximo a região promotora dos genes HBG, reprimindo sua expressão. Polimorfismos em HGB tem sido associados

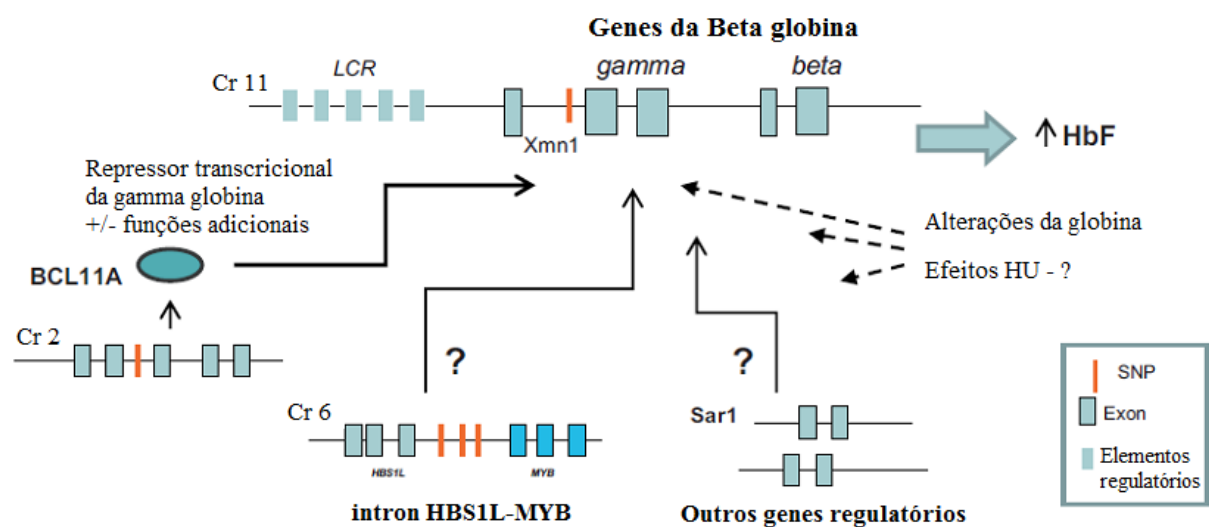
a um fenótipo de síntese continuada de HbF, em indivíduos normais e em portadores de hemoglobinopatias como a HbSS (UDA *et al.*, 2008; SANTOS, 2011).

Os mecanismos dos processos que influenciam a polimerização da HbS estão bem caracterizados. Porém, a explicação para a heterogeneidade fenotípica e a ampla variabilidade clínica da AF permanece ainda desconhecida.

Existem vários fatores identificados como moduladores da clínica da AF, entre eles a concentração de HbF, grupos de haplótipos da beta globina e a presença dos polimorfismos como o *BCL11A*, associados a expressão de HbF (LETTRE *et al.*, 2008). A concentração de HbF é bem conhecida como um parâmetro laboratorial importante, bem definido, que quando aumentada está associada com menor risco de complicações vaso-oclusivas, danos a órgãos e mortalidade (PLATT *et al.*, 1994).

Os diferentes SNPs determinantes na regulação da HbF, foram determinados através dos estudos de associação em todo o genoma (GWAS), o qual revelou forte associação com SNPs em três diferentes genes ou locus gênicos, como a maioria fortemente associada com a expressão de HbF: *Xmn1*-*HBG2*, *HBS1L*-*MYB*, e *BCL11A* (Figura 6) (GREEN; BARRAL, 2011).

Figura 7. O locus da beta globina e interação com outros loci em populações normais e de adultos com AF.



Um único SNP no íntron 2 do oncogene BCL11A no cromossomo 2p16 em populações saudáveis é responsável por 15% da variabilidade de células F. O BCL11A é um fator de transcrição linfóide, indispensável para o desenvolvimento da linhagem linfóide e cuja expressão desregulada está envolvida em leucemias (GREEN; BARRAL, 2011) (Figura 7). Estudos em cultura de células precursoras eritróides e *in vivo* em camundongos modificados com AF demonstraram que BCL11A liga-se ao *locus* da globina beta e desempenha um papel direto na inibição na substituição da globina gama pela beta, regulando a expressão de HbF (GALARNEAU *et al.*, 2010).

As variantes intrônicas dos SNPs no gene BCL11A estão associados com maior ou menor produção de HbF. Desta forma os SNPs do gene BCL11 regulam a expressão de HbF modificando a globina através de uma mutação estrutural que afeta a cinética de crescimento e a diferenciação dos glóbulos vermelhos (Figura 7) (THEIN *et al.*, 2009).

Recentemente, estudos de associação genética localizaram vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que são reprodutivelmente associados com a variação na expressão de HbF, na idade adulta em populações europeias saudáveis (THEIN, *et al.*, 2007; MENZEL, *et al.*, 2007; UDA, *et al.*, 2008). Estes SNPs estão localizados em BCL11A o gene no cromossomo 2 e no HBS1L-MYB, região intergênica no cromossomo 6. Estas descobertas iniciais foram feitas em populações anêmicas (europeus do norte e sardos), em que o nível de expressão é geralmente de 1% de HbF. Uda *et al.* (2008) também obtiveram resultados sugerindo que o polimorfismo genético do BCL11A pode ser um importante modulador genético da gravidade da doença em pacientes com beta -talassemia (UDA, *et al.*, 2008). Estudos posteriores, relatam a replicação da associação entre um SNP BCL11A e os níveis de HbF em pacientes com anemia falciforme (LETTRE *et al.*, 2008; SEBASTIANI *et al.*, 2015; BITOUNGUI; NGOGANG; WONKAM, 2014).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos polimorfismos do gene BCL11A nos processos inflamatório, hemolítico, estresse oxidativo crônicos e nas concentrações de HbF e HbS e sua relação com os haplótipos do gene da beta globina S, a fim de melhorar a compreensão da patogenia da AF, dos pacientes acompanhados no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC),

em Fortaleza-Ceará, permitindo a busca de outras alternativas terapêuticas que possam reduzir os fenômenos patológicos, que determinam o comprometimento multi-sistêmico característico da AF, melhorar a evolução clínica da doença, resultando em ganho na qualidade e expectativa de vida dos pacientes, diante do cenário atual de poucas opções de tratamento. A pesquisa em questão tem relevância porque dá seguimento a uma linha de pesquisa do grupo, genética clínica, da Universidade Federal do Ceará, da Faculdade de Farmácia, com a finalidade de fornecer subsídios para futuros projetos, principalmente direcionados à detecção de fatores de prognóstico com vista em alvos terapêuticos, uma vez que a doença não possui tratamento específico, sendo curativo apenas através do transplante de medula óssea (TMO).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

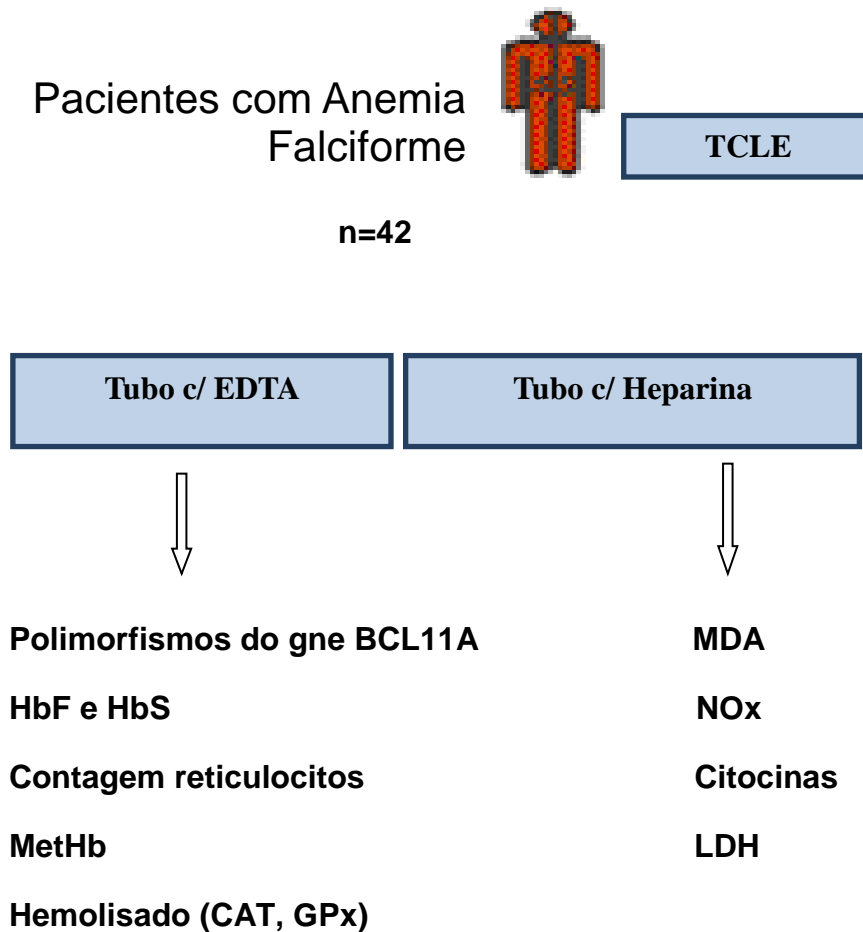
Avaliar a modulação genética do BCL11A no perfil inflamatório, hemolítico, no estresse oxidativo, nas concentrações da HbF, nos pacientes portadores de Anemia Falciforme.

2.2 Específicos

- Avaliar a frequência alélica dos polimorfismos rs4671393, rs7557939 e rs1186868 do gene BCL11A na população em estudo;
- Identificar a modulação dos polimorfismos rs4671393, rs7557939 e rs1186868 do gene BCL11A em relação ao sexo e a idade na população em estudo;
- Determinar a modulação dos polimorfismos rs4671393, rs7557939 e rs1186868 do gene BCL11A nas regiões nas concentrações da HbF e HbS , nos pacientes em estudo;
- Avaliar a associação dos SNPs rs4671393, rs7557939 e rs1186868 do gene BCL11A com os haplótipos do gene da beta globina S;
- Analisar a modulação dos SNPs rs4671393, rs7557939 e rs1186868 do gene BCL11A com o perfil inflamatório, hemolítico e no estresse oxidativo;
- Avaliar a modulação dos SNPs rs4671393, rs7557939 e rs1186868 do gene BCL11A em relação aos eventos clínicos dos pacientes com AF.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística



Foram selecionadas as amostras provenientes dos 42 pacientes com AF, de ambos os sexos, após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os pacientes com AF foram selecionados de forma voluntária, de acordo com os critérios de seleção da amostra. Trata-se de um estudo de corte transversal e analítico, no qual foram utilizadas amostras de 42 pacientes com diagnóstico molecular de AF, atendidos no ambulatório de Hematologia do HUWC, em Fortaleza, Ceará. O estudo foi realizado no ambulatório de Hematologia do HUWC e no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) do curso de Farmácia da UFC e no Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN).

Tamanho da amostra: O centro onde ocorreu o estudo é referência em doenças hematológicas no Ceará, onde são atendidos aproximadamente 150 pacientes com AF, oriundos das regiões de todo o estado do Ceará. O nosso “n” amostral representou aproximadamente 28,0% dos pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no município de Fortaleza, Ceará.

Crítérios de inclusão: Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes adultos, em acompanhamento no ambulatório de Hematologia do HUWC, da Universidade Federal do Ceará (UFC), com diagnóstico clínico e molecular de AF (HbSS). Os participantes do estudo estavam no estado estacionário da doença, segundo os critérios estabelecidos por Ballas (2012): ausência de episódios dolorosos e/ou doenças intercorrentes, tais como infecções e inflamações nas quatro semanas anteriores ao estudo; ausência de admissões hospitalares nos últimos 2-3 dias antes do estudo e ausência de transfusão de sangue nos quatro últimos meses, anteriores ao estudo.

Crítérios de exclusão: Impossibilidade de obtenção TCLE, pacientes que realizaram terapêutica transfusional nos últimos três meses, que faziam uso de quelante de ferro e/ou de vitaminas antioxidantes, tabagistas, etilistas, gestantes, portadores de diabetes mellitus, insuficiência renal ou hepática.

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta das amostras biológicas

Após consentimento do paciente, foram colhidas amostras de sangue periférico em tubos contendo anticoagulante EDTA e tubo com gel separador que foram utilizados para a pesquisa dos polimorfismos do gene BCL11A (por PCR em tempo real), dosagens da HbF, HbS (por HPLC); as dosagens séricas de IL-6, IL-17, TNF- α , IL-10 e de TGF- β (por Elisa). Realizou-se a contagem de reticulócitos (por metodologia manual); dosagens séricas de LDH, da MetHb, atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), nos eritrócitos dos pacientes, e as determinações plasmáticas do MDA e nitrito através da técnica espectrofotométrica. Os haplótipos do gene da beta globina S foram obtidos dos prontuários dos pacientes, realizados previamente ao estudo, pelo LPHDGH do

Curso de Farmácia da UFC (SILVA, et al, 2009). Também, as informações demográficas e clínicas foram obtidas dos prontuários.

3.2.2 Dosagem de HbF e HbS

A determinação da concentração de HbF foram realizadas através de HPLC.

3.2.3 Dosagens das citocinas

As Citocinas IL-6, IL-17, TNF- α , IL-10 e TGF- β foram dosadas por Elisa utilizando-se kits da BD- BIOSCIENCES, seguindo o seguinte protocolo:

3.2.4 Determinação dos parâmetros de hemólise

-Contagem de reticulócitos(Ret.): foi realizada através de contagem manual utilizando-se o corante supravital azul de cresil brilhante em sangue com anticoagulante EDTA.

-Dosagem de metemoglobina (MetHb): foi realizada por método espectrofotométrico, segundo a metodologia proposta por Naoum et al (2000). Essa técnica fundamenta-se na avaliação da solução de hemoglobina, previamente estabilizada em tampão fosfato, 60 mol L⁻¹ em dois comprimentos de onda específicos para metemoglobina (630 nm) e oxihemoglobina (540 nm). Foi utilizado tampão fosfato 60 mol L⁻¹ e saponina a 1% como reagentes.

-Dosagem de Lactato desidrogenase (LDH): foi realizada por metodologia cinética utilizando-se kits da marca Labtest® e seguindo o protocolo específico para a sua determinação em equipamentos semi-automatizados da marca LabQuest®.

3.2.5 Testes do estresse oxidativo

-Protocolo para determinação da concentração de Malonaldeído (MDA) (DRAPER; HADLEY, 1990):

O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico -TBARS. Nessa reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo que tem absorvância máxima em solução ácida em 532nm a 535nm. A quantificação foi realizada por espectrofotometria de acordo com o protocolo empregado, que consiste na incubação de 150 μ L de plasma em banho-

maria a 37° por 1 h, seguido por adição de 200µL de ácido perclórico a 35%, para precipitar as proteínas. Em seguida realizou-se a centrifugação a 14.000rpm por 10 min, após, foi adicionado ao sobrenadante, 100µL de uma solução de tiobarbiturato de Sódio a 0,6%. A amostra permaneceu em banho-maria aquecido entre 90 e 100°C por 30 min. Após resfriada, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 560nm.

-Determinação da concentração de Nitrito (NOx) (GREEN et.al., 1981):

Este método se baseia na detecção da presença de nitrito em amostras biológicas (urina, plasma, homogenado tecidual) através de uma reação de diazotização com formação de um cromóforo de cor rósea.

-Atividade enzimática da Catalase (CAT) (AEBI, 1984):

A atividade da catalase (CAT) nas hemácias foi determinada por método espectrofotométrico, monitorando a decomposição do H₂O₂ a 240nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

-Protocolo para determinação da atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx)

A medida da GSH-Px nos eritrócitos foi determinada utilizando o *kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay® (Sigma-Aldrich)*. O kit utiliza método de determinação indireta da enzima. A análise é baseada na oxidação da glutathione reduzida (GSH) para glutathione oxidada (GSSG), catalizada pela GPx utilizando a glutathione redutase (GR) e fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH). A diminuição na absorbância do NADPH medida a 340 nm, durante a oxidação de NADPH para NADP é indicativo da atividade de GPx.

3.2.6 Determinação dos Moduladores genéticos

-Extração do DNA genômico: O DNA foi isolado de leucócitos, a partir de amostras de sangue total, colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Foram utilizados kits de extração da BIOPUR®.

Após a realização do protocolo de extração, todas as amostras de DNA extraído foram quantificadas no aparelho NANODROP, para posterior amplificação gênica. As amostras foram armazenadas a -20° C até o momento da utilização.

Após quantificação em NANODROP (ND-1000; NANODROP TECHNOLOGIES INC., WILMINGTON, DE, EUA), alíquotas de DNA foram utilizadas como molde em reações de PCR quantitativa em tempo real. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (HIGUCHI *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada. As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando-se o reagente VIC/FAM, *PCR Master Mix*® (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA, EUA), que além de conter todos os reagentes necessários para a PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, *Taq Ampli-Gold*), contém o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de dupla fita. Além disso, utilizaram-se também amostra de DNA e *primers* específicos para o gene analisado. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA, EUA) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95°C/10minutos, seguindo-se 40 ciclos: 92°C/15segundos – 60°C/1minuto.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 SEQUENCE DETECTOR SYSTEM® (APPLIED BIOSYSTEMS) e os resultados foram apresentados pelo programa GENEAMP® 5700 SDS (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA, EUA) em gráficos de fluorescência *versus* número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou Ct.

A caracterização dos polimorfismos no gene BCL11A, no cromossomo 2, neste estudo foi realizado por PCR em tempo real no aparelho APPLIED BIOSYSTEMS de acordo com protocolo do kit da LIFE TECHNOLOGIES®. A análise dos polimorfismos no gene BCL11A foi realizada através dos SNPs rs11886868, rs 4671393 e rs 7557939 por PCR em tempo real (qPCR).

Foram considerados o genótipo AA como selvagem e GG como mutante para o polimorfismo rs4671393, o genótipo selvagem GG e mutante AA para rs7557939 e

o genótipo CC como selvagem e o mutante TT para o SNP rs1186868 do gene BCL11A.

GENE: BCL11A

SNP ID 7557939: A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 7 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do SNP 755; e 5 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 10 minutos; acrescida de 40 ciclos compreendendo desnaturação a 92°C por 15 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto. A análise foi realizada no software do termociclador 7500 Real Time PCR System (APPLIED BIOSYSTEMS), na função para genotipagem.

Localização do Cromossomo: Cr.2: 60721347 - 60721347

Polimorfismo: A/G, Substituição

Sequencia [VIC/FAM]:

TACATCCTTGAGCTACACAGGCTAA[**A/G**]CAAGAGTGAGAGAGGGTGATGCTGA

SNP ID 4671393: A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 7 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do SNP 467; e 5 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 10 minutos; acrescida de 40 ciclos compreendendo desnaturação a 92°C por 15 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto. A análise foi realizada no software do termociclador 7500 REAL TIME PCR SYSTEM (APPLIED BIOSYSTEMS), na função para genotipagem.

Localização do Cromossomo: Cr.2: 60720951 - 60720951

Polimorfismo: A/G, Substituição

Sequencia [VIC/FAM]:

CCAGTGCTGTGGACAGCAAAGCTTC[**A/G**]GTGCAGGAAATTAAGATTCCCCCTG

SNP ID 11886868: A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 7 µL de água para injeção; 12,5 µL de Master Mix; 0,5 µL do SNP 118; e 5 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 10 minutos; acrescida de 40 ciclos compreendendo desnaturação a 92°C por 15 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto. A análise foi realizada no software do termociclador 7500 REAL TIME PCR SYSTEM (APPLIED BIOSYSTEMS), na função para genotipagem.

Localização do Cromossomo: Cr.2: 60720246 - 60720246

Polimorfismo: C/T, Substituição

Sequencia [VIC/FAM]:

TATCGTCTTTTGTGTTTAATTTCTT[C/T]CACAGAGCAGAATGATTCTGGGATT

Descarte do Material Biológico

O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.3 Aspectos Éticos

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e executado segundo os princípios e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 466/2012, sob protocolo N° 122.12.10.

3.4 Análise Estatística

Toda a análise estatística foi realizada usando o software livre R, na versão 3.1.2. Para análise da frequência do sexo e dos genótipos, por região e das associações entre o tipo de haplótipo e dos eventos clínicos com as regiões do BCL11A, foram usados os testes de Qui-quadrado e o exato de Fisher. Realizou-se

o teste paramétrico de ANOVA (obtido sob suposições distribucionais), bem como o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise da associação dos genótipos do gene BCL11A com a idade, os níveis de HbS, HbF, perfil inflamatório, hemolítico e do estresse oxidativo. Foi considerado significativo ao nível de 5%.

4 RESULTADOS

Caracterização da população estudada

Foram avaliados 42 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de AF confirmado por biologia molecular, em estado basal da doença e em tratamento com HU (Hydréia® na dose de 20mg/kg/dia), há mais de um ano, com objetivo de analisar a influência do modulador genético BCL11A no perfil inflamatório (IL-6, TNF-alpha, IL-10, TGF- β), hemolítico (MetHb, Ret, LDH), no estresse oxidativo (NOx, MDA, CAT, GPx), níveis de hemoglobina fetal e na evolução clínica dos pacientes com Anemia Falciforme, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza, Ceará, no período de março de 2013 a março de 2015.

Figura 8: Distribuição dos pacientes segundo o sexo.

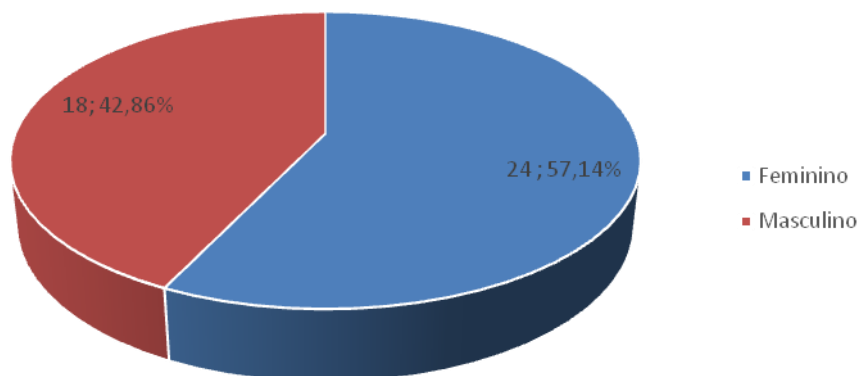


Tabela 1: Estatísticas descritivas das variáveis idade, Hemoglobina Fetal (%) e Hemoglobina S (%) dos pacientes incluídos no estudo.

	Amplitude	Q1	Mediana	Q3	Média	Desvio-padrão	CV
Idade	18-65	26,3	33,0	40,3	35,1	12,0	34,2%
HbF (%)	1,9-32,2	7,9	10,9	18,9	13,1	8,2	62,5%
HbS (%)	63,5-96,0	75,7	83,3	40,3	82,0	8,5	10,4%

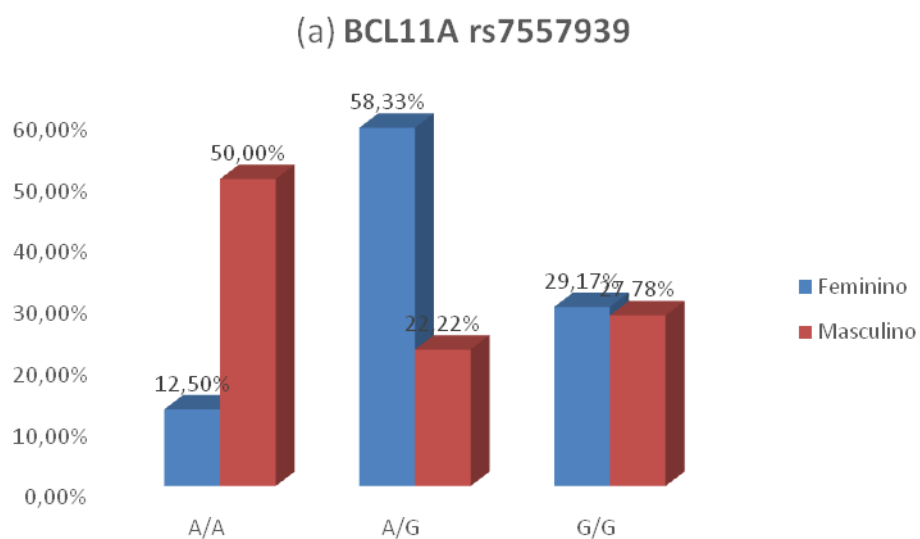
A maioria dos pacientes (57,14%) é do sexo feminino. A idade dos pacientes incluídos está entre 18 e 65 anos, apresentando um valor médio e mediano de 35,1 anos e 33 anos, respectivamente.

Tabela 2: Valores-p dos testes para igualdade entre proporções dos genótipos por região.

Região	Qui-quadrado
BCL11A rs7557939	0,0366*
BCL11A rs4671393	0,4244
BCL11A rs1186868	0,4326

Apenas na região BCL11A rs7557939, existe evidência estatística, ao nível de 5%, de que um genótipo seja o mais prevalente. Pode-se concluir que o genótipo A/G é o mais prevalente para a região em questão.

Figura 9: Distribuição do sexo segundo genótipo por região.



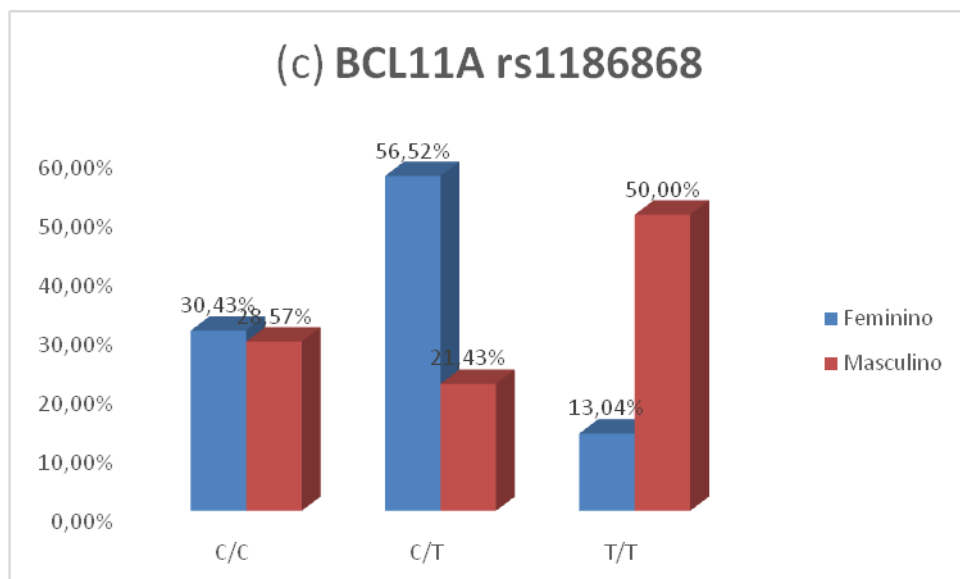
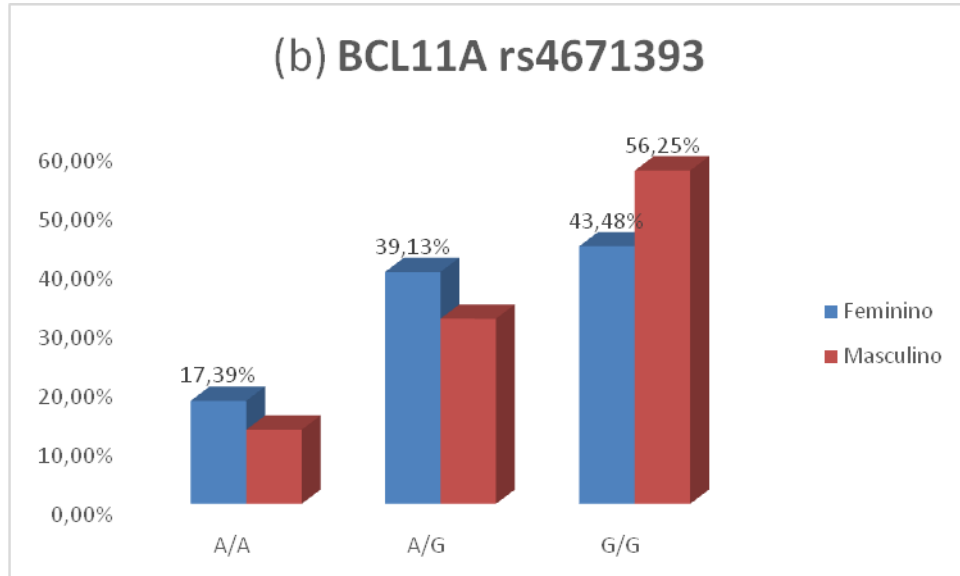


Tabela 3: Valores-p dos testes de associação entre sexo e genótipo, por região.

Região	Qui-quadrado	Exato de Fisher
BCL11A rs7557939	0,0166*	0,0202*
BCL11A rs4671393	0,7313	0,7492
BCL11A rs1186868	0,0320*	0,03194*

Pela Tabela 3, conclui-se que não existe relação entre sexo e genótipo, apenas na região BCL11A rs4671393, ao nível de 5%. Pela Figura 9(a), pode-se concluir que na região BCL11A rs7557939 existe uma prevalência maior das mulheres para o genótipo A/G, enquanto os homens tem uma prevalência maior no genótipo A/A. Já na região BCL11A rs1186868, a maioria (56,52%) das mulheres apresentam o genótipo C/T, enquanto a metade dos homens apresentam o genótipo T/T.

Figura 10: Avaliação da Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868), no perfil médio (\pm erro-padrão da média) da idade, por genótipo e região.

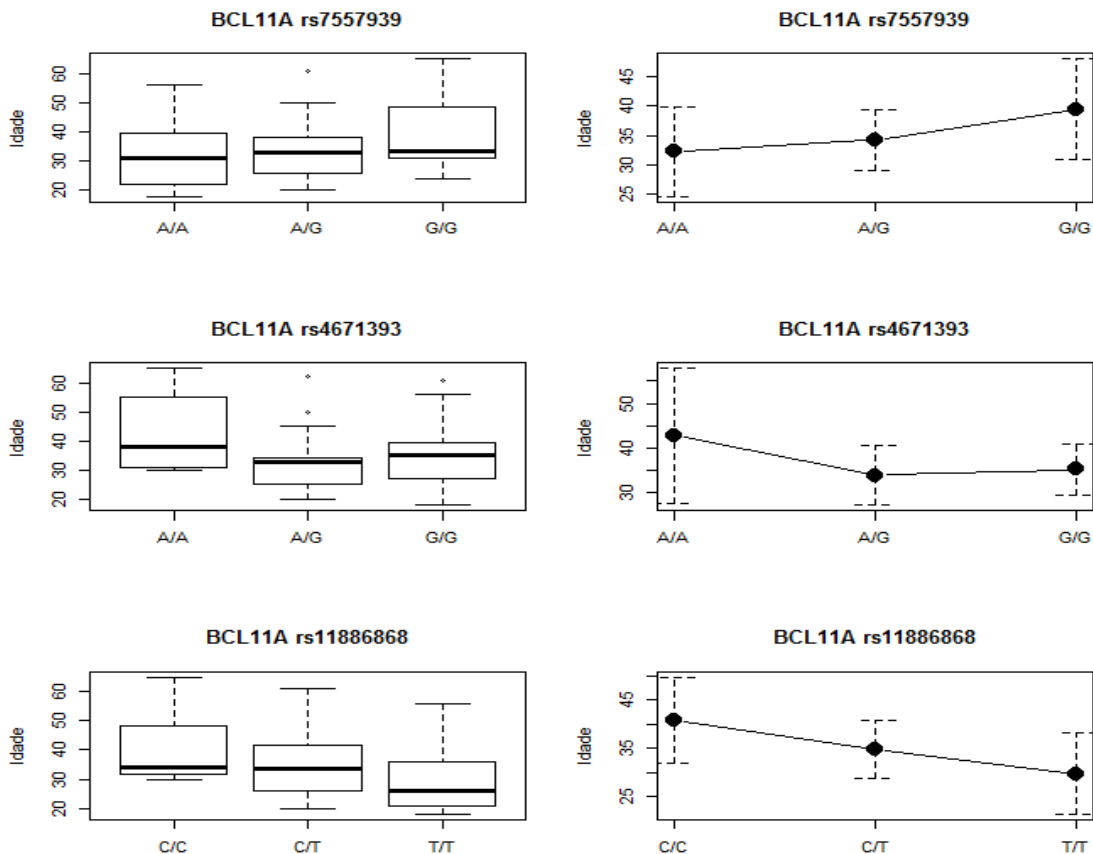


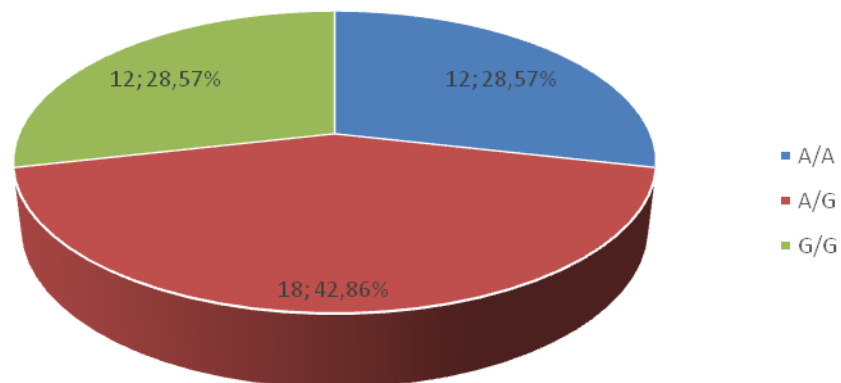
Tabela 4: Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas das idades por genótipo, para cada uma das regiões.

Região	ANOVA	Kruskall-Wallis
BCL11A rs7557939	0,3195	0,5000
BCL11A rs4671393	0,3087	0,3993
BCL11A rs1186868	0,1219	0,1789

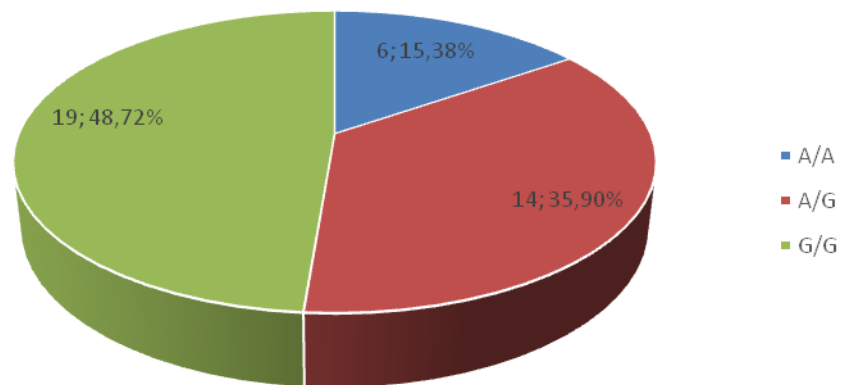
Pela Tabela 4, podemos concluir que não existe diferença entre as médias/medianas das idades por genótipo, para cada uma das três regiões, ao nível de 5%.

Figura 11: Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene BCL11A para cada uma das três regiões. (a) BCL11A rs7557939, (b) BCL11A rs4671393, (c) BCL11A rs1186868.

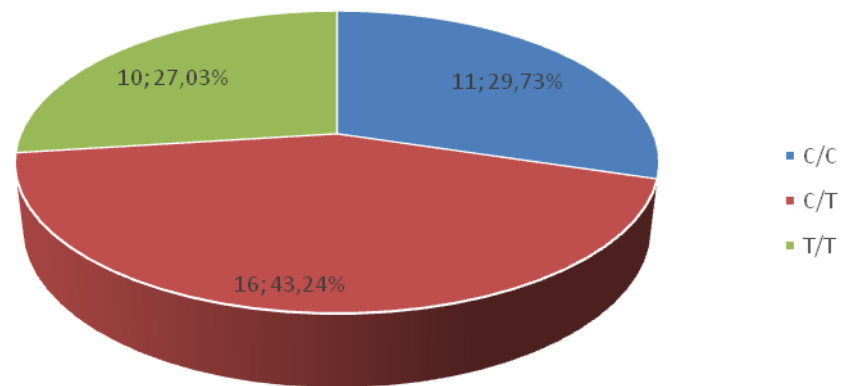
(a) BCL11A rs7557939



(b) BCL11A rs4671393



(c) BCL11A rs1186868



Não foi possível determinar o polimorfismo para 3 pacientes na região BCL11A rs4671393 e para 5 pacientes na região BCL11A rs1186868. Tais pacientes, foram excluídos da análise. Na Tabela 5, apresentamos os valores-p dos testes de associação das regiões do BCL11A com os três grupos de haplótipos (BANTU/BANTU; BANTU/BENIN e BENIN/BENIN).

Tabela 5: Valores-p dos testes de associação entre o tipo de haplótipo e as regiões do BCL11A.

Região	Qui-quadrado	Exato de Fisher
BCL11A rs7557939	0,4950	0,5911
BCL11A rs4671393	0,3525	0,3046
BCL11A rs1186868	0,5810	0,6505

Nenhuma região apresentou associação significativa com os grupos de haplótipos, logo, não há uma prevalência maior de um dos haplótipos com alguma região específica do BCL11A.

Modulação entre os genótipo do polimorfismo do gene BCL11A com HbS.

Foi realizada a comparação entre os genótipos dos três SNPs do gene BCL11A com a média da HbS dos pacientes em estudo, com objetivo de avaliar a associação entre os três genótipos. Na Figura 12 pode-se verificar que somente na região BCL11A rs1186868 houve diferença significativa na média/mediana de HbS dos genótipos, ao nível de 5%. Utilizando testes de comparações múltiplas paramétricos e não paramétricos, pode-se concluir ao nível global de 5% que a média/mediana de HbS dos pacientes com genótipo T/T é estatisticamente maior que a média/mediana de HbS dos pacientes com genótipo C/C, não havendo diferença no número médio/mediano de pacientes com genótipo T/T comparativamente aos pacientes com genótipo C/T e nem dos pacientes com genótipo C/T, comparativamente aos pacientes com genótipo C/C.

Figura 12 : Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868), na concentrações da HbS, nos pacientes com AF (n=42).

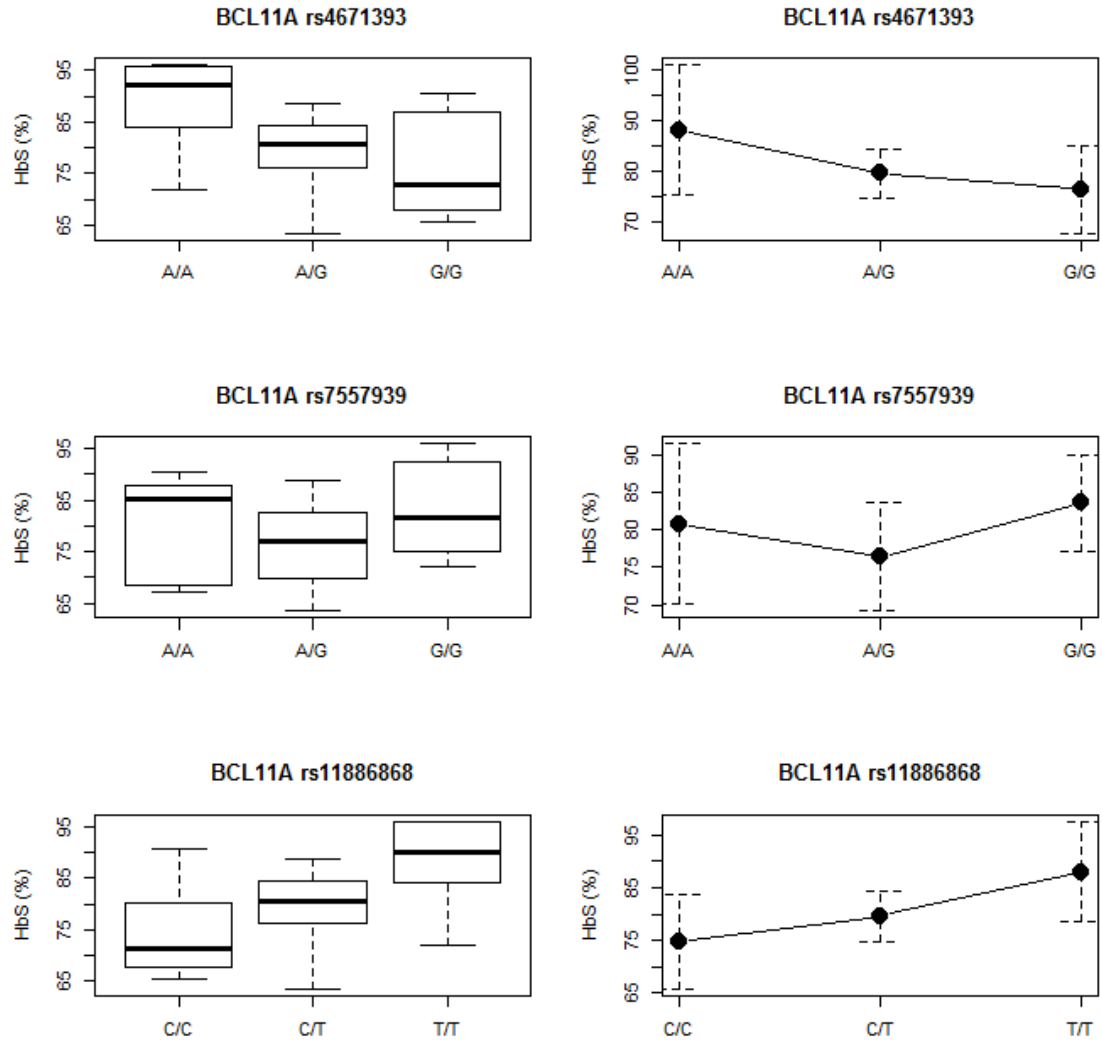


Tabela 6: Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas de HBS (%) dos genótipos por região.

Região	ANOVA	Kruskall-Wallis
BCL11A rs7557939	0,0914	0,0993
BCL11A rs4671393	0,2700	0,3026
BCL11A rs1186868	0,0341*	0,0433*

Modulação dos genótipo do polimorfismo do gene BCL11A com a concentração da HbF, nos pacientes com AF.

Figura 13 : Modulação genética do SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868), na concentrações da HbF, nos pacientes com AF (n=42).

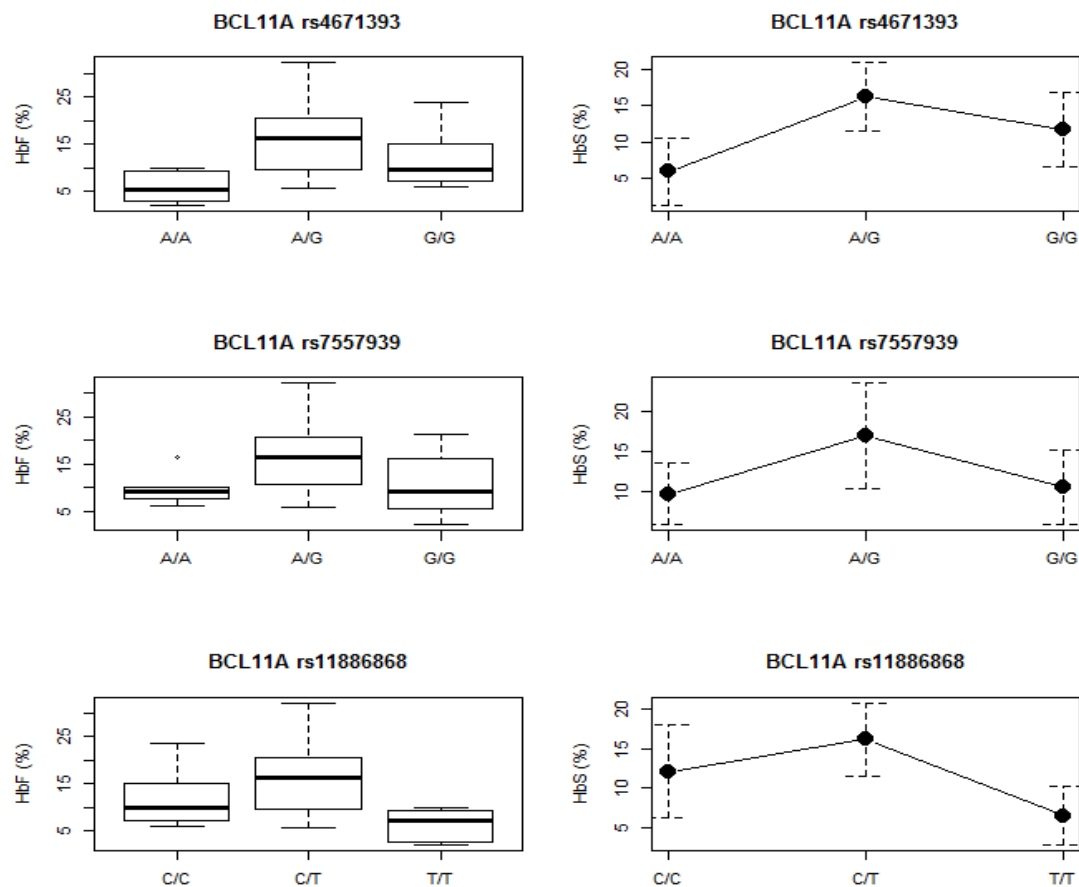


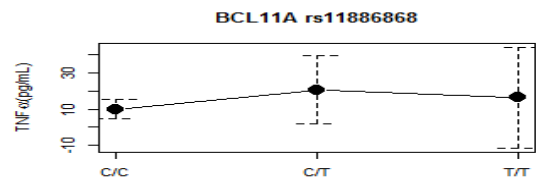
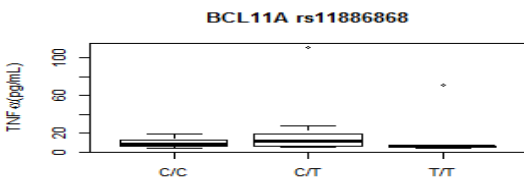
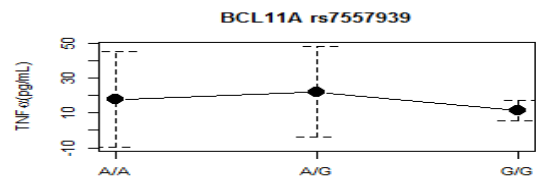
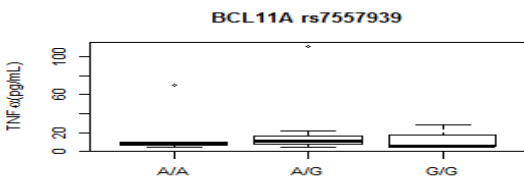
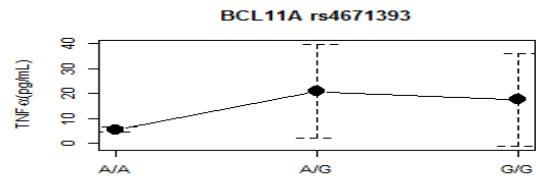
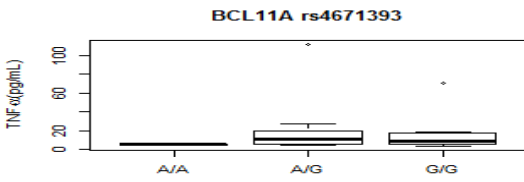
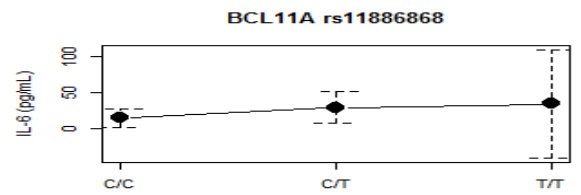
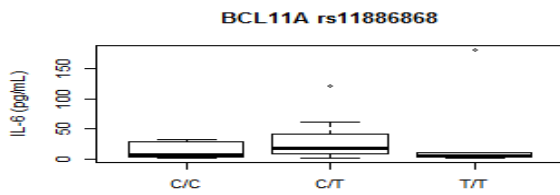
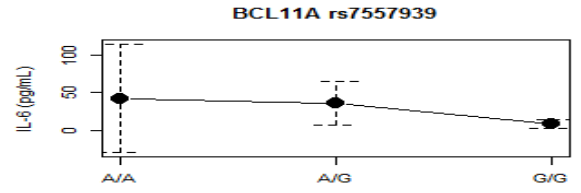
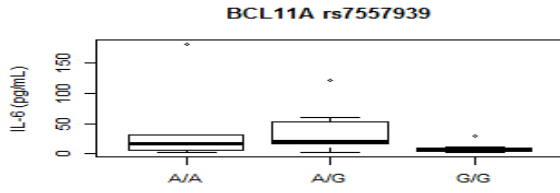
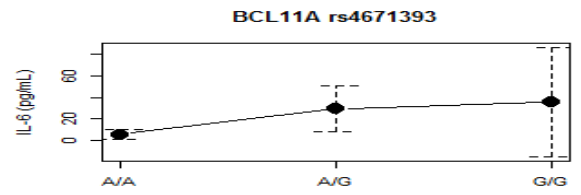
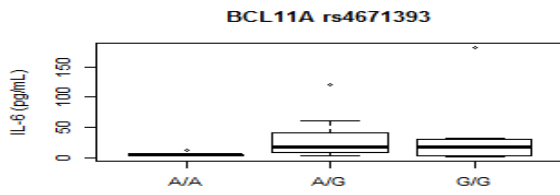
Tabela 7: Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medias de HbF (%) dos genótipos por região.

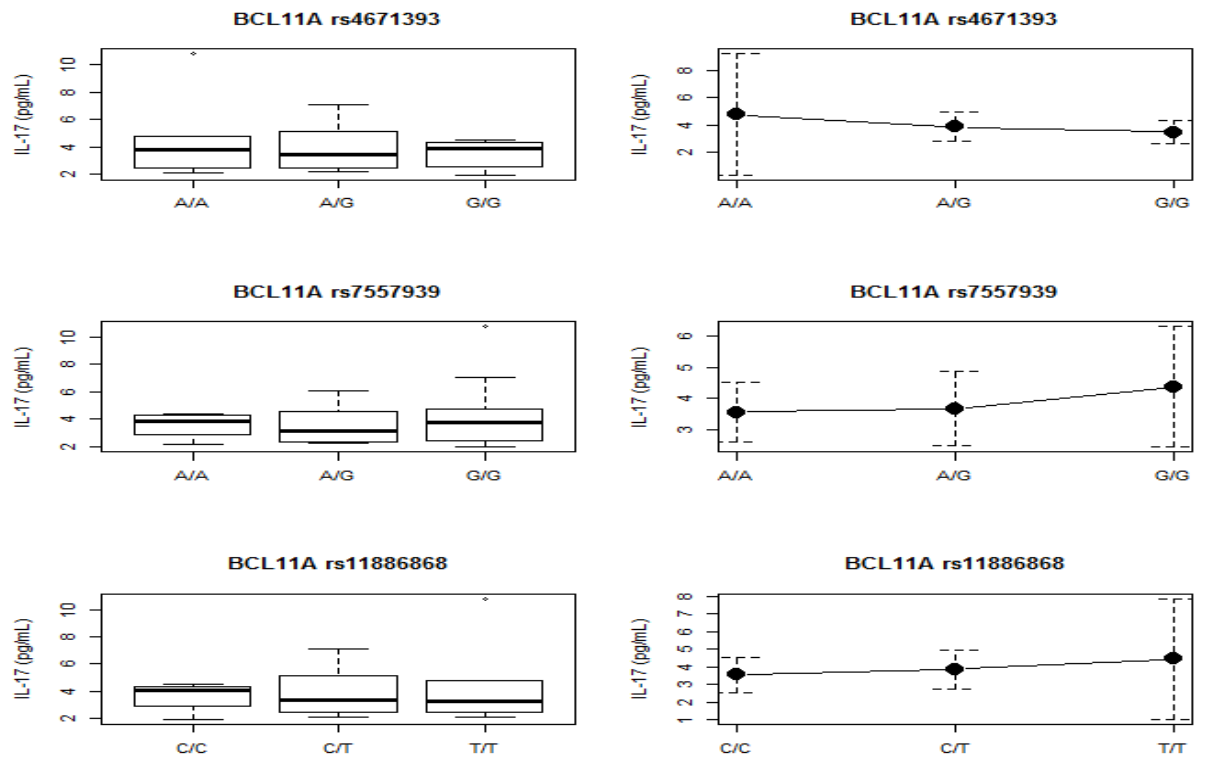
Região	ANOVA	Kruskall-Wallis
BCL11A rs7557939	0,0195*	0,0258*
BCL11A rs4671393	0,0832	0,1565
BCL11A rs1186868	0,0197*	0,0278*

Somente na região BCL11A rs4671393 não houve diferença significativa na média/mediana de HbF dos genótipos, ao nível de 5%. Utilizando testes de comparações, podemos concluir ao nível global de 5% que nas regiões BCL11A rs7557939 e BCL11A rs1186868, o número médio/mediano de HbF para pacientes com genótipo A/G é estatisticamente superior ao número médio/mediano de HbF para pacientes com genótipo A/A, não havendo diferença do número médio/mediano de HbF entre pacientes com genótipos A/G e G/G, e também entre A/A e G/G. A Figura 13 pode-se verificar que somente na região BCL11A rs1186868 houve diferença significativa na média/mediana de HbS dos genótipos, ao nível de 5%. Utilizando testes de comparações múltiplas paramétricos e não paramétricos, pode-se concluir ao nível global de 5% que a média/mediana de HbF dos pacientes com genótipo T/T é estatisticamente menor que a média/mediana de HbF dos pacientes com genótipo C/C, não havendo diferença no número médio/mediano de pacientes com genótipo T/T comparativamente aos pacientes com genótipo C/T e nem dos pacientes com genótipo C/T, comparativamente aos pacientes com genótipo C/C.

Associação entre os genótipos do polimorfismo do gene BCL11A com os marcadores inflamatórios em pacientes com AF

Tabela 14. Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF-alfa e IL-17), nos pacientes com AF (n=42).





Associação entre os genótipos do polimorfismo do gene BCL11A com os marcadores anti-inflamatórios em pacientes com AF

Figura 15. Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- β), nos pacientes com AF (n=42).

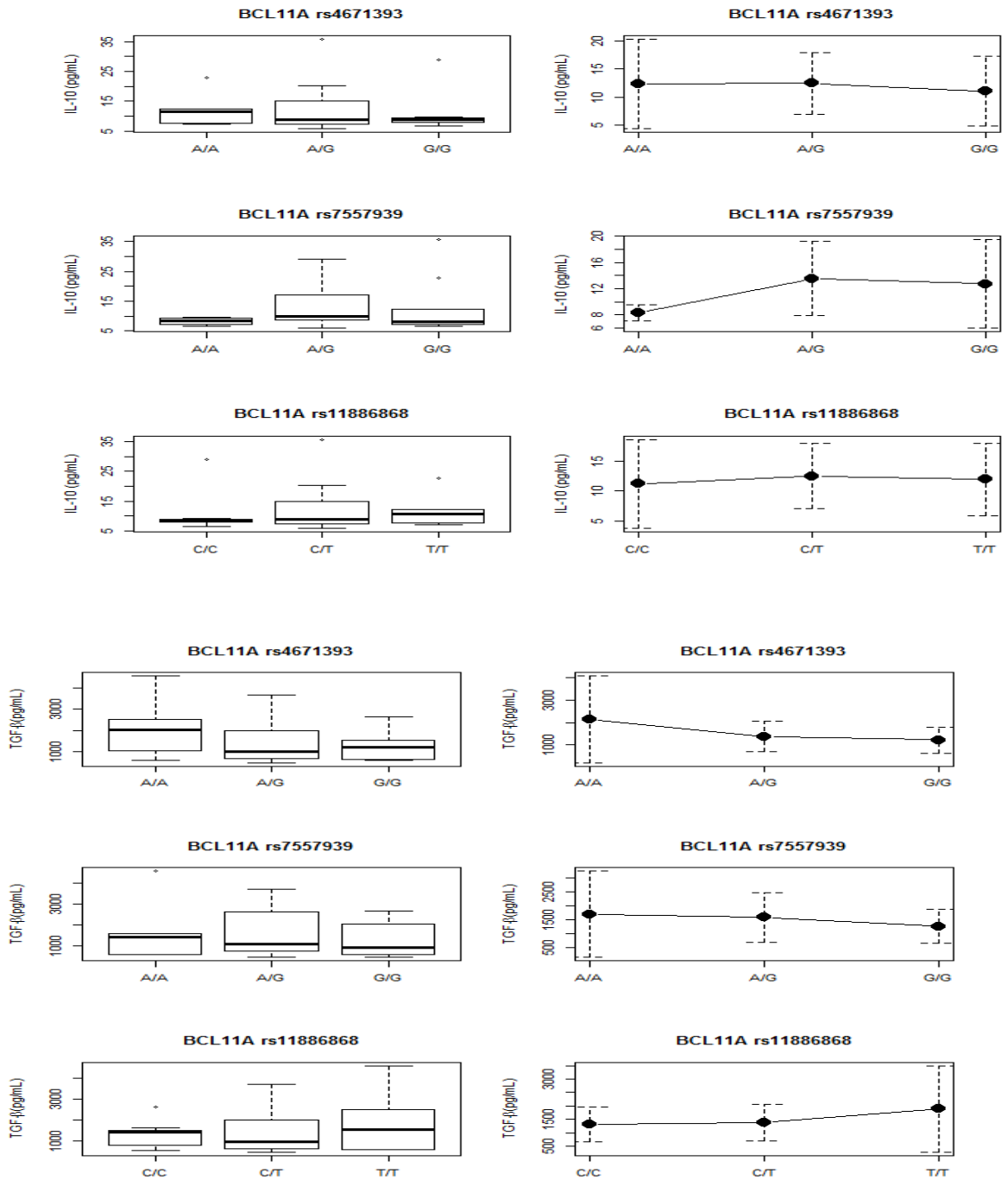


Figura 16. Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) sobre os marcadores de hemólise , nos pacientes com AF (n=42).

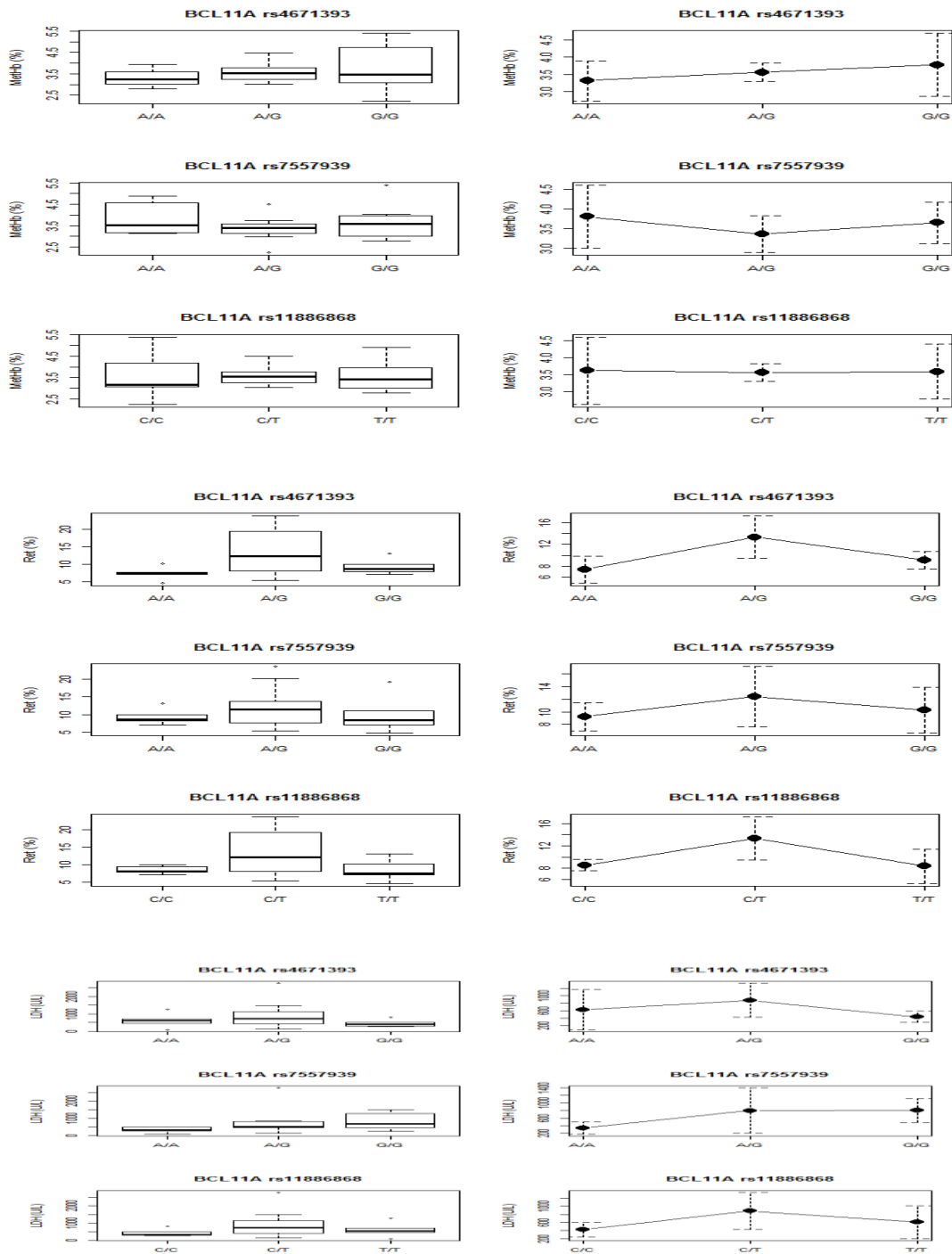
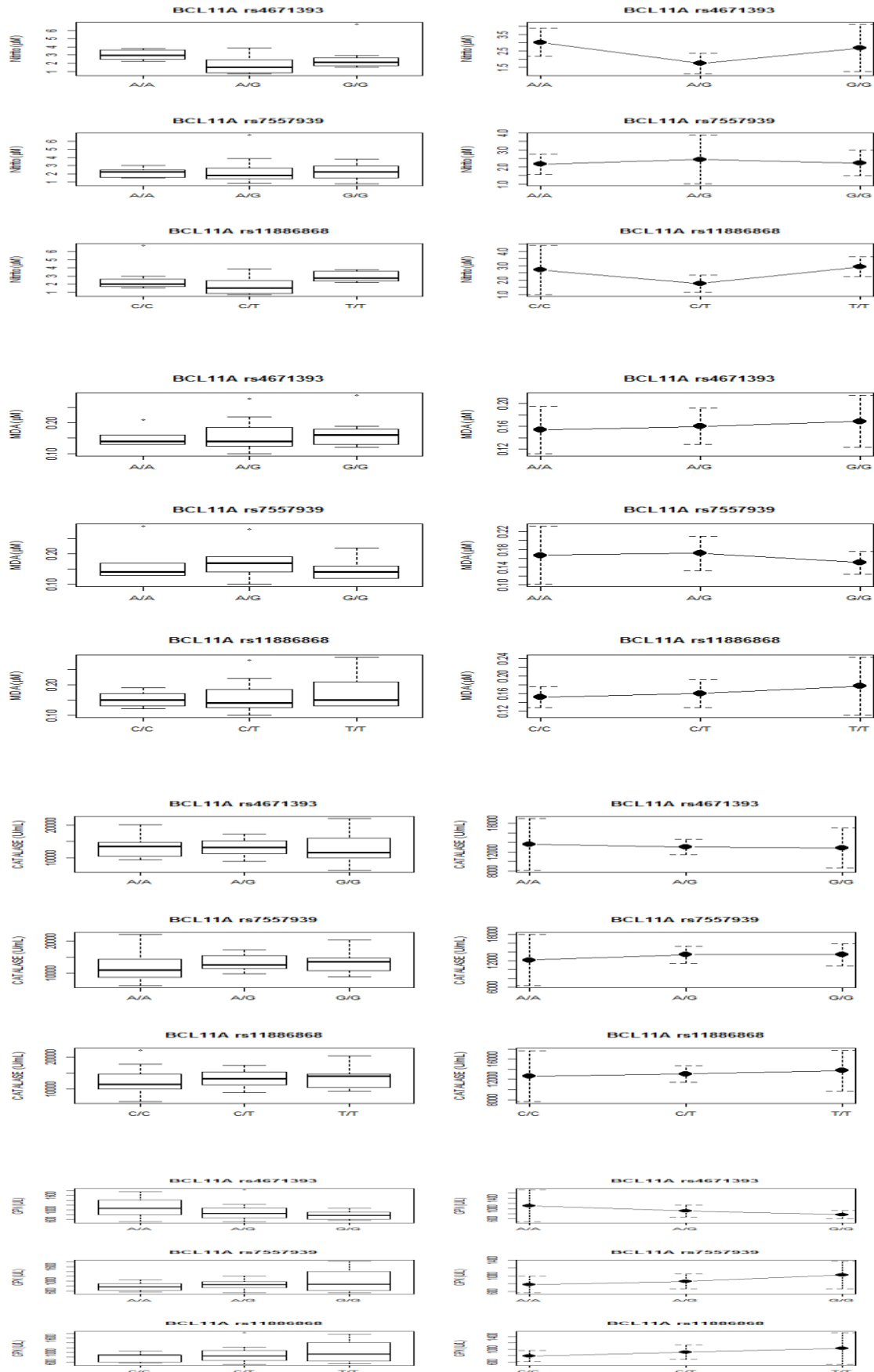


Figura 17. Modulação genética dos SNPs do gene BCL11A sobre os marcadores do estresse oxidativo nos pacientes com AF (n=42).



Nenhuma região apresentou diferença significativa com relação ao número médio/mediano dos dos moduladores inflamatórios, marcadores de hemólise e de estresse oxidativo dos genótipos, ao nível de 5%.

Associação entre os genótipos do polimorfismo do gene BCL11A com os marcadores de hemólise em pacientes com AF

Tabela 8: Valores-p dos testes para igualdade entre médias/medianas dos moduladores inflamatórios, marcadores de hemólise e de estresse oxidativo por genótipo e região.

Parâmetro	BCL11A rs7557939		BCL11A rs4671393		BCL11A rs1186868	
	ANOVA	Kruskall-Wallis	ANOVA	Kruskall-Wallis	ANOVA	Kruskall-Wallis
IL-6(pg/mL)	0,4386	0,1559	0,2006	0,1233	0,6698	0,3360
TNF- α (pg/mL)	0,5045	0,1140	0,6336	0,5926	0,6563	0,3382
IL-17(pg/mL)	0,5328	0,9482	0,6641	0,9692	0,7347	0,9953
IL-10(pg/mL)	0,9136	0,8633	0,4024	0,2561	0,9423	0,7515
TGF- β (pg/mL)	0,3159	0,5938	0,7163	0,6629	0,5990	0,8627
MetHb (%)	0,5364	0,6699	0,4682	0,4545	0,9898	0,9554
Ret (%)	0,0521	0,0980	0,4634	0,6238	0,0529	0,1581
LDH (U/L)	0,2188	0,1574	0,2218	0,0748	0,2229	0,1399
NITRITO (μ M)	0,1046	0,5574	0,9074	0,9553	0,1132	0,6399
MDA (μ M)	0,8620	0,9076	0,6196	0,4800	0,6459	0,8132
CATALASE (U/mL)	0,9459	0,8654	0,7971	0,4991	0,8794	0,7330
GPX (U/L)	0,2572	0,4947	0,3830	0,7804	0,4864	0,7394

Modulação dos genótipos do polimorfismo do gene BCL11A (rs4671393, rs7557939, rs1186868) com eventos clínicos dos pacientes com AF

Foi realizada a avaliar da modulação dos polimorfismos do gene BCL11A(rs4671393, rs7557939, rs1186868) em relação aos eventos clínicos mais recorrentes(Internamentos, transfusões, crises álgicas, litíase, úlceras de pernas, priaprismo, acidente vascular cerebral, hemossiderose, síndrome torácica aguda e infecções nos últimos dez anos (prontuários médicos) nos pacientes com AF, atendidos no ambulatório do HUWC . (Tabela).

Tabela 9. Valores-p dos testes de associação entre os eventos clínicos e a frequência dos genótipos, por região.

Evento Clínico	BCL11A rs7557939		BCL11A rs4671393		BCL11A rs1186868	
	Qui-quadrado	Fisher	Qui-quadrado	Fisher	Qui-quadrado	Fisher
Internamentos	0,8245	0,8871	0,6771	0,8624	0,7524	0,7756
Transfusões	0,4931	0,6284	0,5835	0,6704	0,5385	0,6188
Crises Álgicas	0,4931	0,6284	0,2732	0,3471	0,5395	0,5044
Litíase	0,9839	>0,9999	0,9161	>0,9999	0,6971	0,5195
Úlceras	0,4497	0,5223	0,0895	0,0885	0,7586	0,7675
Necrose Femoral	>0,9999	>0,9999	0,4688	0,7380	0,9341	>0,9999
Priaprisimo	0,9419	>0,9999	0,6268	>0,9999	0,9341	>0,9999
AVC	0,5888	0,8032	0,4807	0,6362	0,5340	0,6669
Hemossiderose	0,2466	0,2511	0,3099	0,5471	0,2259	0,2705
STA	0,2466	0,4983	0,1522	0,2564	0,2497	0,4955
Infecções	0,7897	0,9031	0,7779	0,7986	0,8173	0,8988

Não foram evidenciadas associações significativas, ao nível de 5%, entre os eventos clínicos descritos e os genótipos do BCL11A, nas três regiões supracitadas (Tabela 9).

5 DISCUSSÃO

Embora todos os pacientes com AF apresentem a mesma mutação genética no gene da β -globina que compromete a formação da hemoglobina, observa-se uma ampla variabilidade clínica entre os pacientes, então, é relevante um melhor entendimento dos fatores envolvidos na fisiopatologia AF, que possibilita a identificação dos pacientes com risco maior de evoluir com complicações e, assim, desenvolver melhorias na assistência a estes pacientes através da modificação do curso natural da doença ou da implementação de novas terapias que visem diminuir as intercorrências clínicas da doença.

A maioria dos pacientes (57,14%) é do sexo feminino. A idade dos pacientes incluídos está entre 18 e 65 anos, apresentando um valor médio e mediano de 35,1 anos e 33 anos, respectivamente.

Apenas na região BCL11A rs7557939, existe evidência estatística, ao nível de 5%, de que um genótipo A/G é o mais prevalente para a região em questão.

No presente estudo verificou-se que não existe relação entre sexo e genótipo, apenas na região BCL11A rs4671393, ao nível de 5%. Portanto, pode-se concluir que na região BCL11A rs7557939 existe uma prevalência maior das mulheres no genótipo A/G, enquanto os homens tem uma prevalência maior no genótipo A/A. Na região BCL11A rs1186868, a maioria (56,52%) das mulheres apresentam o genótipo C/T, enquanto a metade dos homens apresentam o genótipo T/T. Em relação a rs1186868 resultados semelhantes foram obtidos por Bhanushali et al, (2015) em 238 pacientes com anemia falciforme da Índia. Verificou-se no presente estudo que não existe diferença entre as médias/medianas das idades por genótipo, para cada uma das três regiões, ao nível de 5%.

Letrre et al. (2008) realizaram um estudo de coorte independente onde avaliaram a frequência dos polimorfismos na população brasileira. Os referidos autores obtiveram prevalência dos alelos A; G e T para as regiões rs7557939, rs4671393 e rs1186868 respectivamente.

Estudos de prevalência tornam-se importantes, pois sugerem a diversidade de origens étnicas da população brasileira, tendo em vista que a presença da AF está relacionada com o componente afro-descendente, devido ao tráfico de escravos oriundos da África vindos ao Brasil (PANTE-DE-SOUZA *et al.*, 1998). A partir de estudos que demonstram a prevalência de determinada mutação em uma população, pode-se entender como uma doença predominantemente genética como a AF, se apresenta com cursos clínicos tão variáveis de acordo com a população a qual acomete.

Hemoglobina S e Fetal

Sebastiani *et al.* (2005) realizaram um estudo com 1398 pacientes com AF, afim de investigar a participação de genes modificadores que poderiam interferir na heterogeneidade clínica da AF. Ao final do trabalho, os pesquisadores demonstraram que 31 SNPs em 12 genes que interagiram com a hemoglobina fetal modulando o risco de acidente vascular cerebral. Dentre os moduladores descritos na literatura encontram-se: (I) os haplótipos da β -globina; (II) os níveis de HbF e (III) a presença de polimorfismo no gene BCL11A, associados a expressão de HbF (STEINBERG, 2009; LETTRE *et al.*, 2008). O presente trabalho avaliou a influência de cada um desses fatores no curso clínico de 42 pacientes com AF em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

O evento inicial da fisiopatologia da AF decorre da polimerização da HbS, que, quando desoxigenada, forma polímeros que tornam as membranas das hemácias rígidas, as quais não maleáveis, transitam através dos capilares sanguíneos resultando em oclusão vascular. A vaso-oclusão, fenômeno comum na fisiopatologia da AF, resulta em hemólise, disfunção endotelial, inflamação crônica e stress oxidativo (REES; GIBSON, 2011).

A fim de avaliar a influência do BCL11A como modulador clínico na AF, realizou-se a associação dos polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP) com os níveis de HbS e HbF desses pacientes. O presente trabalho observou um efeito protetor dos alelos selvagens modulando a produção de HbF e diminuindo a quantidade de HbS.

Para a região rs1186868, os pacientes que possuíam pelo menos um dos alelos selvagem (C/C ou C/T) apresentaram níveis mais elevados de HbF, enquanto que os pacientes homozigotos mutantes (T/T) obtiveram níveis diminuídos com significância estatística. Para a HbS, a mesma região polimórfica demonstrou, com nível de significância, que os indivíduos que possuíam carga gênica selvagem (C/C ou C/T) apresentavam menor quantidade da HbS falcizada quando comparados com indivíduos que possuíam apenas o alelo mutante (T/T).

A análise da região rs7557939 confirma o efeito protetor do alelo selvagem em pacientes com AF. Para essa região polimórfica, observamos que a presença do alelo selvagem G, garantiu aos pacientes G/G e G/A níveis elevados de HbF quando comparados com pacientes homozigotos mutantes A/A. Estes resultados estão de acordo com o Makani et al, 2011 que encontrou no locus rs1186868 e rs4761393 sobre os níveis de expressão de HbF serem maiores para A/A.

Esse efeito protetor dos alelos selvagens foi confirmado por Uda et al. (2008) que constataram que o alelo C da região rs11886868 no gene BCL11A está associada com um melhor fenótipo em pacientes com anemia falciforme, devido ao aumento da produção de hemoglobina fetal nos mesmos.

O mecanismo de acção do BCL11A na regulação dos níveis de HbF ainda é desconhecido, porém trabalhos apontam que este gene pode ligar-se à regiões reguladoras da produção de γ -globina e, assim, estar envolvidos como interruptor molecular que determina a produção relativa de HbF em adultos (QUEK; THEIN, 2007).

Outras evidências anteriores acerca da influência do BCL11A na expressão de HbF demonstram a associação alelo C com altos níveis de HbF, enquanto o alelo T funcionaria como um alelo repressor para a expressão da HbF (LETTRE *et al.*, 2008). Os achados atuais corroboram com tais evidências.

Bhanushali et al, (2015) avaliaram a influencia dos SNPs para o gene do BCL11A na concentração da HbF em 240 pacientes com AF e 60 com o traço falciforme, na Índia. A genotipagem foi realizada para o BCL11A rs11886868 e rs34211119. Os níveis de HbF% obtidos no SNP rs11886868 foram de 20,4%; 19,6% e de 16,8 para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente. Resultados que corroboram com os obtidos no presente estudo. O alelo mutante T está associado

com baixos níveis de HbF%, conseqüentemente com um quadro clínico menos promissor. O estudo concluiu que o alelo mutante T, do SNP rs11886868 reduziu de quase 18% nos níveis de HbF. Lettre *et al.* (2008) encontraram uma associação significativa entre HbF e SNPs no gene BCL11A em dois grupos de pacientes com AF afro-descendentes e brasileiros (n=350). A associação mais significativa foi na região rs4671393 ($p = 3 \times 10^{-8}$) entre os brasileiros). Os SNPs BCL11A poderiam, então, explicar a variação nos níveis de HbF e mais do que 20% da variação fenotípica no traço de HbF. Através de análises estatísticas, os autores demonstraram que níveis elevados de HbF reduziram as crises de dor em pacientes com doença falciforme. Cardoso *et al.*, (2014) também verificaram que os níveis elevados de HbF em pacientes com anemia falciforme no estado do Pará, norte do Brasil foram influenciados principalmente por alelos de BCL11A (rs4671393). Embora a região rs4671393 não demonstre diferença significativa entre os grupos observa-se uma tendência que confirma os resultados anteriores, onde os pacientes com carga gênica selvagem A/A e A/G apresentam valores médios de HbF mais elevados ($88,07 \pm 8,92$) em relação à pacientes homocigotos para a mutação ($76,45 \pm 10,17$).

A análise da relação dos SNPs do gene BCL11A com os haplótipos do gene da beta globina não apresentou nenhuma relação. Pacientes com um haplótipo Bantu têm uma HbF inferior e aqueles com um haplótipo Senegal ou Arábia indiano têm HbF maior; indivíduos com um haplótipo Benin têm níveis de HbF intermediários (AKINSHEYE, *et al.*, 2011).

Os pacientes com AF encontram-se em um estado inflamatório crônico de origem multifatorial que envolve vaso-oclusões recorrentes, crises hemolíticas e respostas inflamatórias contínuas que se manifestam por elevação nos níveis de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, hemólise intravascular e stress oxidativo (ZAGO; PINTO, 2007; CONRAN, COSTA, 2009).

Avaliando a influência do polimorfismo no perfil inflamatório dos pacientes com AF, a pesquisadora observou a importância da IL-6 como fator de prognóstico associado às regiões do gene BCL11A. Embora nenhuma significância estatística tenha sido obtida, a citocina de caráter pró-inflamatória se comportou de forma regular e apresentou tendências de elevação em pacientes homocigotos mutantes

para todas as regiões estudadas. Uma amostragem maior de pacientes certamente evidenciaria em nível de $p < 0,05$ uma diferença entre os grupos de genótipos.

Sabe-se que a IL-6 é sintetizada principalmente por fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos em resposta a outras citocinas, como IL-1 e TNF- α e que a mesma estimula a síntese de mediadores da fase aguda da inflamação e, portanto, está envolvida na resposta inflamatória aguda. Participa também da resposta imune mediada por células, uma vez que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17) e inibe a ação das células T reguladoras (MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000). Esse feedback de estimulação entre as citocinas pró-inflamatórias exacerba ainda mais o estado inflamatório crônico nesses pacientes.

Apesar de estudos que realizem associação entre o SNP no gene BCL11A e mediadores inflamatórios na AF serem ainda inexistentes, outros trabalhos já comprovam o estado inflamatório crônico desses pacientes, evidenciando aumento de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, TNF-alfa e IL-17 (LANARO *et al.*, 2009).

Bandeira *et al.* (2014), realizou um estudo onde pôde comprovar que o haplótipos da β -globina influenciam o perfil inflamatório dos pacientes com AF. Os autores conseguiram demonstrar que pacientes com haplótipo Bantu/Bantu apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e níveis diminuídos de citocinas anti-inflamatórias, quando comparados ao haplótipos Benin/Benin; reiterando o haplótipo Bantu como sendo de pior prognóstico e o haplótipo Benin se estabelecendo com melhor curso clínico da doença.

Seguindo o mesmo paralelo, o presente estudo surge de forma inovadora associando polimorfismos do gene BCL11A com marcadores de inflamação e levanta a conjectura de que indivíduos com carga gênica para os alelos selvagens estejam associados com diminuição de marcadores pró-inflamatórios na AF, como a IL-6.

No que diz respeito aos marcadores anti-inflamatórios, os resultados também demonstram que não houve a modulação genética na IL-10 e TGF- β em todas as regiões. Sabe-se que o TGF- β atua como modulador da produção de HbF. A presença de três variantes gênicas de sinalização da citocina (TGFB2, TGFB3 e

BMP6) contribuem para um aumento da chance de AVC em pacientes com AF e em indivíduos saudáveis, uma vez que ocorre modulação dos níveis de HbF. Os pesquisadores inferiram essa associação com precisão de 98,2% (SEBASTIANI *et al.*, 2005).

Na AF, estudos relacionam o TGF como um marcador urinário de disfunção renal, e associam SNPs no gene da citocina com um aumento na predisposição para o AVC e para a hipertensão pulmonar (STEINBERG, 2009; MOHTAT *et al.*, 2011), porém trabalhos que avaliem sua associação com polimorfismos genéticos no gene BCL11A ainda são desconhecidos.

Não houve associação entre a os genótipos do BCL11A e os marcadores de hemólise no presente estudo. Estudos demonstram que a LDH encontra-se elevada na AF, pois a enzima participa da instauração do quadro hemolítico nos pacientes com AF uma vez que a hemólise intravascular dos eritrócitos falciformes promove liberação de hemoglobina livre, arginase, e lactato desidrogenase (LDH) no plasma sanguíneo (ELIAS *et al.*, 2012; STOJANOVIC *et al.*, 2012). A MetHb é liberado fisiologicamente no plasma pelos sistemas redutores quando ocorre a oxidação da hemoglobina e seus níveis séricos situam-se abaixo de 2%. Seu excesso na AF pode ser explicada pela excessiva oxidação da hemoglobina (HbS) ou pela diminuição da atividade das enzimas redutoras (NASCIMENTO, 2008). Laurentino *et al.* (2014) demonstrou o excesso de MetHb em pacientes falciformes e ainda correlacionou o tratamento com hidroxiuréia à diminuição desses níveis e, portanto, maior proteção hemolítica em pacientes tratados.

Por se tratar de uma das células da linhagem precursora eritróide com maior capacidade de aderência endotelial, os reticulócitos são de grande importância para o fenômeno de vaso-oclusão e encontram-se em maior número nos pacientes com AF, contribuindo para a instauração do quadro inflamatório crônico. Os reticulócitos dos pacientes com AF apresentam-se na forma ativados e expressam em sua superfície o complexo de integrinas que se liga à fibronectina e à VCAM-1 endoteliais; além do receptor CD-36 que interage com a CD-36 presente nas células endoteliais (KASSCHAU; BARABINO, 1996).

Com o intuito de estabelecer uma associação entre os genótipos do polimorfismo BCL11A e o quadro de estresse oxidativo característico da AF, foram

realizadas as análises com moléculas oxidantes (MDA e NOx) e antioxidantes (Catalase e GPx). Estudos tem demonstrado um aumento nos níveis de MDA e NOx e uma redução nos antioxidantes em pacientes adultos em Fortaleza, Ceará, em estado estacionário (ELIAS, *et al.*, 2012; GONÇALVES, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo não demonstraram nenhuma associação a nível de significância de $p < 0,05$ com nenhum dos biomarcadores do estresse oxidativo. Estudos que associem esses marcadores oxidativo com os genótipos polimórficos do gene BCL11A ainda são inexistentes na literatura.

Apesar dos resultados do presente estudo demonstrarem uma importante influencia dos SPNs do gene BCL11A sobre a concentração da HbF, principal modulador clínico, na doença, não observamos nenhuma influencia dos mesmos com os eventos clínicos (internamentos, transfusões, crises algicas, litíase, úlceras necrose femoral, priapismo, AVC, hemossiderose, STA, Infecções) analisados. Os resultados não estão de acordo com dados da literatura, onde se demonstra que SNPs do gene BCL11A estão associados com a redução de crises algicas (SMITH, *et al.*, 2008; LETTRE *et al.*, 2008). A discordância dos resultados do estudo com os acima citados pode ser atribuída a vários fatores dentre eles a principalmente a subnotificação dos eventos clínicos, ausência de um posto de emergência para os pacientes com anemia falciforme do referido serviço e das dificuldade de vagas em leitos nos hospitais universitários como o HUWC, na maioria dos estados do Brasil, entre outros. O fato é que os atuais estudos apontam para que indicadores genéticos que interferem na HbF, na doença falciforme, possam ser utilizados como biomarcadores de prognóstico.

6 CONCLUSÕES

Apenas na região BCL11A rs7557939, existe evidência estatística de que um genótipo A/G é o mais prevalente;

Não há uma prevalência maior de um dos haplótipos do gene da beta globina S com as regiões do BCL11A avaliadas;

Houve um efeito modulador genético em duas regiões do gene BCL11A, demonstrando que os alelos mutantes apresentam baixos níveis de HbF, resultados que consolidam que o polimorfismo do gene BCL11A modulam o curso clínico da doença , apesar das não associações com os demais biomarcadores.;

Portanto, os resultados confirmam a hipótese de que os alelos selvagens em algumas regiões, para os níveis de HbF, conferem uma propriedade protetora na AF, enquanto que a presença do alelo mutante confere pior prognóstico. Indicando que a determinação da genotipagem nesse locus pode servir como um indicador prognóstico.

REFERENCIAS

- ADEKILE, A.D. What's New in the Pathophysiology of Sickle Cell Disease? **Med Princ Pract.** , v..22, p.311-312, 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** , v.105, p. 121-126, 1984.
- AKINSHEYE, I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFF, N et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood** , v. 118, n.1, p.19–27, 2011.
- AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E.; KOREN, A.; LEVIN, C., et al. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **Br. J. Haematol.**, v. 132, p. 108-113, 2006.
- ANDEMARIAM, B.; OWARISH-GROSS, J.; GRADY, J.; BORUCHOV, D.; THRALL, R.S.; HAGSTROM, J.N. Identification of risk factors for an unsuccessful transition from pediatric to adult sickle cell disease care. **Pediatr. Blood Cancer** , v.61, p.697-701, 2014.
- ANTONARAKIS, S.E.; BOEHM, C.D.; SERJEANT, G.R.; THEISEN, C.E.; DOVER, G.J.; KAZAZIAN, HH. Origin of the β S-globin gene in Blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p.853-856, 1984.
- ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 899, p. 375–391, 2000.
- ASLAN, M.; CANATAN, D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. **Exp Hematol.** v. 36, n. 11, p. 1535-1544, 2008.
- BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data. **Am J Hematol.**, v. 87, n. 3, p. 338, 2012.
- BALLAS, S.K. Sickle cell anemia: progress in pathogenesis and treatment. **Drugs** , v.62, p. 1143–1172, 2002.
- BALLAS, S.K.; MARCOLINA, M.J. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. **Transfusion**, v.46, n.1, p.105-110, 2006.
- BANDEIRA, I.C.; ROCHA, L.B.; BARBOSA, M.C.; ELIAS, D.B.; QUERIOZ, J.A.; FREITAS, M.V.; GONÇALVES, R.P. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB(*)S haplotype. **Cytokine**. v.65, n.2, p.217-21, 2014.
- BELCHER, J.D.; MARKER, P.H.; WEBER, J.P.; HEBBEL, R.P.; VERCELLOTTI, G.M. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vasoocclusion. **Blood.**, v.96, n. 7, p.:2451-2459, 2000.

BHANUSHALI, A.A.; PATRA, P.K.; PRADHAN, S. et al. Genetics of fetal hemoglobin in tribal Indian patients with sickle cell anemia. **Transl Res.** , v. 165, n.6, p. 696-703, 2015.

BITOUNGUI, V.J.; NGOGANG, J.; WONKAM, A. Polymorphism at BCL11A compared to HBS1L-MYB loci explains less of the variance in HbF in patients with sickle cell disease in Cameroon. **Blood Cells Mol Dis.** , v. 54, n.3, p.268-269, 2015.

BOGER, R.H.; BODE-BOGER, S.M. The clinical pharmacology of L-arginine. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.79-99, 2001.

BROWNE, P.; SHALEV, O.; HEBBEL, R.P. The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. **Free Radic Biol Med.**, v.24, n.6, p. 1040- 1048, 1998.

BUDHIRAJA, R.; TUDER, R.M.; HASSOUN, P.M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. **Circulation.**, v.109, n.2, p.159-165, 2004.

BUNN, H. F., NOGUCHI, C. T., HOFRICHTER, J., SCHECHTER, G. P., SCHECHTER, A. N., et al. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 7527–7531, 1982.

CARDOSO, G.L. Estudo de fatores genéticos moduladores da heterogeneidade fenotípica da Anemia Falciforme no estado do Pará. Dissertação de Mestrado, 2005. UFPA, 123p.

CARDOSO, G.L.; DINIZ, I.G.; SILVA, A.N. et al. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. **Blood Cells Mol Dis.**, v.53, n.4, p.176-179, 2014.

CHARACHE, S. Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease. **Adv. Pediatr.**, v. 37, p. 1–31, 1990.

CHARACHE, S.; DOVER, G.J.; MOORE, R.D.; ECKERT, S.; BALLAS, S.K.; KOSHY, M.; MILNER, P.F.; ORRINGER, E.P. et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood.** , v.79, n.10, p.2555-2565, 1992.

CHARACHE, S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. **Semin. Hematol.**, v. 34, p.15–21, 1997.

CONRAN, N.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin.**, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

DAMANHOURI, G.A.; JARULLAH, J.; MAROUF, S.; HINDAWI, S.I., MUSHTAQ, G.; KAMAL, M.A. KAMAL. Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi J Biol Sci.** , v. 22, n.1, p.24-31, 2015.

- DAS, S.K.; NAIR, R.C. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. **Br. J. Haematol.**, v 44, p. 87–92, 1980.
- DASGUPTA, T.; HEBBEL, R.P.; KAUL, D.K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 41, p. 1771-1780, 2006.
- DAVID, J.M.; BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- DRAPER, H.H.; HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** , v.186, p. 421-431, 1990.
- EATON, J.W.; SKELTON, T.D.; SWOLFFORD, H.S.; COLPIN, C.E.; JACOB, H.S; Elevated erythrocyte calcium in sickle cell disease. **Nature.** , v.246, n.5428, p.105-106,1973.
- ELIAS, D. B.; ROCHA, L. B.; CAVALCANTE, M. B.; PEDROSA, A. M.; JUSTINO, I. C.; GONÇALVES, R. P. Correlation of low levels of nitrite and high levels of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease at baseline. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 34, n. 4, p. 265-9, 2012
- FERREIRA, E.M.C.D. Factores Genéticos Moduladores do Fenótipo da Drepanocitose. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Portugal, 2011.
- FIGUEIREDO, M.S. Agentes indutores da síntese de hemoglobina fetal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 313-315, 2007.
- FRANCO, R.S.; YASIN, Z.; PALASCAK, M.B.; CIRAOLO, P.; JOINER, C.H.; RUCKNAGEL, D.L. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. **Blood** , v. 108, n.3, p.1073–1076, 2006.
- FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest** , v. 117, n.4, p.850-858, 2007.
- GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. Physiology of the endothelium. **Br. J. Anaesth.** , v.93, n.1, p.105-113, 2004.
- GALARNEAU, G.; PALMER, C.D.; SANKARAN, V.G.; ORKIN, S.H.; HIRSCHHORN, J.N.; LETTRE G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. **Nat. Genet.**, v. 42, n.12, p.1049-1051, 2010.
- GALILI, U.; CLARK, MR.; SHOHET, S.B. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. **J, Clin, Invest.**, v. 77, n.1, p.27-33, 1986.

GLADWIN, M.T. ; SACHDEV, V.; JISON, M.L.; et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 886–895, 2004.

GLADWIN, M.T. Current and future therapies of sickle cell anemia: an historical perspective. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.** p.176, 2008.

GONÇALVES, R.P. Nitric oxide status in sickle cell anemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** , v.34, n.4, p. 255, 2012.

GONÇALVES, R.P.; ELIAS, D.B.; MAGALHÃES, H.I.; DE SOUZA, J.H. Study of correlation of nitrite levels with malonaldehyde and the prognosis of patients with sickle cell disease on hydroxyurea, Ceará-Brazil. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 25, n.5, p.369-373, 2011.

GREEN, L.C.; LUZURIAGA, K.R.; WAGNER, D.A. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.78, p.7764-7768, 1981.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Genetic Modifiers of HbF and Response to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 56, p. 177–181, 2011.

GREISENEGGER, S.; ENDLER, G.; HSIEH, K.; TENTSCHERT, S.; MANNHALTER, C.; LALOUSCHEK, W. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events? **Stroke.** ,v. 35, n.7, p.1688-1691, 2004.

GUEGUEN, A.; MAHEVAS, M.; NZOUAKOU, R.; HOSSEINI, H.; HABIBI, A.; BACHIR, D.; BRUGIERE, P.; LIONNET, F.; RIBEI, J.A.; GODEAU, B.; GIROT, R.; IBRAHIMA, V.; CALVET, D.; GALACTÉROS, F.; BARTOLUCCI, P. Sickle-cell disease stroke throughout life: a retrospective study in an adult referral center. **Am. J. Hematol.**, v. 89, n.3, p. 267–272, 2014.

HEBBEL, R.P. Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. **Am. J. Hematol.**, v. 86, n.2, p 123–154, 2011.

HEBBEL, R.P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J Clin Invest.** , v.100(11 Suppl):S83-6, 1997.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. . Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)** v.11, n. 9, p.1026-1030, 1993.

HUANG, J.; KIM-SHAPIRO, D.B.; KING, S.B. Catalase-Mediated Nitric Oxide Formation from Hydroxyurea. **J. Med. Chem.**, v.47, p.3495-3501, 2004.

KARIO, K.; MATSUO, T.; NAKAO, K. Cigarette smoking increases the mean platelet volume in elderly patients with risk factors for atherosclerosis. **Clin. Lab. Haematol.**, v.14, n.4, p.281-287, 1992.

KASSCHAU, M.R.; BARABINO, G.A.; BRIDGES, K.R.; GOLAN, D.E. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**, v. 87, n.2, p.771-780, 1996.

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

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F.; LITTLE, J.A.; TAYLOR 6TH, J.; MORRIS, C.R.; NICHOLS, J.S.; WANG, X.; POLJAKOVIC, M.; MORRIS JR., S.M.; GLADWIN, M.T.; Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, p. 2279–2285, 2006.

KAUL, D.K.; ZHANG, X.; DASGUPTA, T.; et al. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 295, n. 1, p.39-47, 2008.

KEIKHAEI, B.; MOHSENI, A.R.; NOROUZIRAD, R.; ALINEJADI, M.; GHANBARI, S.; SHIRAVI, F.; SOLGI, G. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **Eur. Cytokine Netw.** v.24, n.1, p.45-52, 2013.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v.30, p. 620–650, 2002.

KRAJEWSKI, M.L.; HSU, L.L.; GLADWIN, M.T. The proverbial chicken or the egg? Dissection of the role of cell-free hemoglobin versus reactive oxygen species in sickle cell pathophysiology. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.295, n.1, p.4-7, 2008.

KULOZIK, A.E.; WAINSCOAT, J.S.; SERJEANT, G.R, et al. Geographic survey of β S-globin gene haplotypes: evidence for the independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **Am J Hum Genet.** v. 39, n.2, p:239-244, 1986.

LABIE, D.; PAGNIER, J.; LAPOUMEROUILLIE, C.; ROUABHI, F.; DUNDA-BELKHODJA, O.; CHARDIN, P. et al. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in betathalassemia and sickle cell anemia patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, n.7, p.2111-2114, 1985.

LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; ALBUQUEQUE, D.M.; SAAD, S.T.; CONRAN, N.; COSTA, F.F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J. Leukoc. Biol.**, v.85, n.2, p.235-242, 2009.

LANZKRON, S.; STROUSE, J.J.; WILSON, R.; BEACH, M.C.; HAYWOOD, C.; PARK, H.; WITKOP, C.; BASS, E.B.; SEGAL, J.B. Systematic review:

hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 148, n.12, p. 939-955, 2008.

LAPOUMÉROULIE, C.; DUNDA, O.; DUCROCQ, R. et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Hum. Genet.**, v. 89, p.333-337, 1992.

LAURANCE, S.; LANSIAUX, P.; PELLAY, F.X.; HAUCHECORNE, M.; BENECKE, A.; ELION, J. et al. Differential modulation of adhesion molecule expression by hydroxycarbamide in human endothelial cells from the micro- and macro circulation: potential implications in sickle cell disease vaso-occlusive events. **Haematologica.**, v.96, n.4, p.534-542, 2011.

LAURENTINO, M.R.; CARVALHO, T.M.J.P. ; SANTOS, T.E.J., et al. Methemoglobin measure in adult patients with sickle-cell anemia: influence of hydroxyurea therapy. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 50, n. 3, p. 184-188, 2014.

LEIKIN, S.L.; GALLAGHER, D.; KINNEY, T.R.; SLOANE, D.; KLUG, P.; RIDA, W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Pediatrics.** v. 84, n.3, p. 500-508, 1989.

LETTRE, G.; SANKARAN, V. G.; BEZERRA, M. A. C.; ARAÚJO, A. S.; UDA M. et al., DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 105, n. 33, p. 11869–11874, 2008.

LIN, E.E.; RODGERS, G.P.; GLADWIN, M.T. Hemolytic anemia-associated pulmonary hypertension in sickle disease. **Curr. Hematol. Rep.** , v.4, n.2, p.117-125, 2005.

LOUREIRO, M.M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. **Rev Saúde Pública** , v.;39 p. 943-949, 2005.

LUTHRA, N.G.; SEARS, D.A. Increased Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, and Na⁺ + k⁺ ATPase activities in erythrocytes of sickle cells anemia. **Blood.** v.60, n.6, p.1332-1336,1982.

MAKANI, J.; MENZEL, S.; NKYA, S.; COX, S.E.; DRASAR, E.; SOKA, D.; KOMBA, A. N.; MGAYA, J.; ROOKS, H.; VASAVDA, N.; FEGAN, G.; NEWTON, C. R.; FARRALL, M.; THEIN, S. L. Genetics of Fetal Hemoglobin in Tanzanian and British Patients With Sickle Cell Anemia. **Blood.**v. 117, p. 1390-1392, 2011.

MAKIS, A.C.; HATZIMICHAEL, E.C.; BOURANTAS, K.L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Ann. Hematol.** , v.79, n.8, p.407-413, 2000.

MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L.L.; GRIEBELER, I.H.; SANTIN, A.P.; BRANDA ~O, V.D. M., et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 100,p. 897–902, 2008.

MENZEL, S.; GARNER, C.; GUT, I. et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nat. Genet.**, v. 39, p.1197–1199, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília (DF): Anvisa 2002; 9-11.

MOHTAT, D.; THOMAS, R.; DU, Z.; BOAKYE, Y.; MOULTON, T.; DRISCOLL, C.; WORONIECKI, R.; Urinary transforming growth factor beta-1 as a marker of renal dysfunction in sickle cell disease. **Pediatr. Nephrol.**, v. 26, p. 275–280, 2011.

MOHANDAS, N.; ROSSI, M.E.; CLARK, M.R. Association between morphologic distortion of sickle cells and deoxygenation-induced cation permeability increase. **Blood.** v. 68, n.2, p.450-454, 1986.

MORRIS, C.R.; KATO, G.J.; POLJAKOVIC, M., et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **JAMA.** v.294,n.1,p.81-90, 2005.

NAGEL, R.L.; FABRY, M.E.; PAGNIER, J. et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. **N Engl J Med.** V. 312, n. 14, p. 880-884, 1985.

NAGEL, R.L.; LABIE, D. DNA haplotypes and the beta S globin gene. **Prog. Clin. Biol. Res.** , v. 316B, p.371-393, 1989.

NAHAVANDI, M.; WYCHE, M.Q.; PERLIN, E.; TAVAKKOLI, F.; CASTRO, O. Nitric Oxide Metabolites in Sickle Cell Anemia Patients after Oral Administration of Hydroxyurea; Hemoglobinopathy. **Hematology**, v.5, n.4,p.335-339, 2000.

NAOUM, P.C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter.**v.22, n. 01, p.05-22, 2000.

NASCIMENTO, T.S.; PEREIRA, R.O.L.; MELLO, H.L.D. et al. Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, n. 58, v. 6, p. 651-664, 2008.

NATTA, C. L., CHEN, L. C., AND CHOW, C. K. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. **Acta Haematol.**, v. 83, p.130–132, 1990.

NUR, E.; BRANDJES, D.P.; SCHNOG, J.J. et al. Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. **Br. J. Haematol.**, v.151, n.1, p. 62-69, 2010.

OWUSU-ANSAH, A.; CHOI, S.H.; PETROSIUTE, A.; LETTERIO, J.J.; HUANG, A.Y. Triterpenoid inducers of Nrf2 signaling as potential therapeutic agents in sickle cell disease: a review. **Front. Med.**, v.9, n.1, p.46-56,2015.

PAGNIER, J.; MEARS, J.G.; DUNDA-BELKHODJA, O. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 1771-1773, 1984.

PALEK, J; THOMAE, M; OZOG D. Red cell calcium content and transmembrane calcium movements in of sickle cells anemia. **J. Lab. Clin. Med.**, v.89, n.6, p.1365-1374, 1977.

PANTE-DE-SOUSA, G.; MOUSINHO-RIBEIRO, R.C.; SANTOS, E.J.M.; ZAGO, M.A.; GUERREIRO, J.F. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trades and internal migrations. **Genet. Mol. Biol.**, v.21, n.4, p. 427-430, 1998.

PASSOS, C.P.; MACHADO, P.D.C.S.; TORALLES, M.B.P. et al., O VEGF na doença falciforme: Revisão de Literatura. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, v. 9, n. 1.1, p. 83-88, 2010.

PINHEIRO L.S; GONÇALVES, R.P.; TOMÉ, C. A. S. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** vol.28 no.2, 2006.

PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F.; MILNER, P.F.; CASTRO, O.; STEINBERG, M.H. *et al.* Mortality in sickle cell disease: Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 23, p.1639-1644, 1994.

PLATT, O.S.; THORINGTON, B.D.; BRAMBILLA, D.J.; MILNER, P.F.; ROSSE, W.F.; VICHINSKY, E, *et al.* Pain in sickle cell disease: Rates and risk factors. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n.1, p. 11-16, 1991.

PRABHAKAR, N. R.; KUMAR, G. K.; NANDURI, J.; SEMENZA, G. L. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 9, n.9, p. 1397–1403, 2007.

QUEK, L.; THEIN, S.L. Molecular therapies in beta-thalassaemia. **Br. J. Haematol.**, v.136, n.3, p.353-65, 2007.

RAGHAVACHARI, N.; XU, X.; HARRIS, A.; et al. Amplified expression. Profiling of platelet transcriptome reveals changes in arginine metabolic pathways in patients with sickle cell disease. **Circulation.**, v.115, n.12,p.1551-1562, 2007.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 156, p. 433 – 445, 2011.

REES, D.C.; DICK, M.C.; HEIGHT, S.E.; O'DRISCOLL, S.; POHL, K.R.; GOSS, D.E.; DEANE, C.R. A simple index using age, hemoglobin, and aspartate transaminase predicts increased intracerebral blood velocity as measured by transcranial Doppler scanning in children with sickle cell anemia. **Pediatrics**, v. 121, p.e1628–e1632, 2008.

REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E., et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat. Med.**, v. 8, n.12, p. 1383-1389, 2002.

SANTOS, N.J.G. **Hemoglobina fetal em Indivíduos com anemia falciforme e persistência hereditária da hemoglobina fetal**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia-Brasil, 2011.

SCHACTER, L.; WARTH, J. A.; GORDON, E. M.; PRASAD, A.; KLEIN, B. L. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **FASEB J.**, v. 2, p. 237–243, 1988.

SEBASTIANI, P. ; FARRELL, J.J.; ALSULTAN, A. et al. BCL11A enhancer haplotypes and fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood Cells, Mol. Dis.**, v. 54, p. 224–230,2015.

SEBASTIANI, P., RAMONI, M. F., NOLAN, V., BALDWIN, C. T., STEINBERG, M. H. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat. Genet.**, v.37, p. 435-440, 2005.

SEBASTIANI, P.; SOLOVIEFF, N.; HARTLEY, S.W. et al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. **Am. J. Hematol.** v. 85, p. 29–35, 2010.

SHIMIZU, K.; KEINO, H.; TERASAWA, T. et al. Elevated haemoglobin F in juvenile and adult chronic myelogenous leukaemia. **Acta Haematol.**, v.80, n.1, p.28-33, 1988.

SILVA, L.B.; GONÇALVES, R.P., MARTINS, M.F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n.6, pp. 417-420, 2009.

SILVA, M.C., SHIMAUTI,E.L. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com Anemia Falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**,v28,n.2,p:144-148, 2006.

SMITH, W.R., et al. Daily assessment of pain in adults with sickle cell disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 148, p.94–101, 2008.

STEINBERG, M.H. & SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol.**, v. 87, n.8, p. 824–826, 2012.

STEINBERG, M.H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **Sci. World J.**, v. 9, p. 46–67, 2009.

STOJANOVIC, K. S.; STEICHEN, O.; LEFEVRE, G.; et al. High lactate dehydrogenase levels at admission for painful vaso-occlusive crisis is associated with severe outcome in adult SCD patients. **Clin. Biochem.**, v. 45, p. 1578-1582, 2012.

STROUSE, J.J.; LANZKORN, S.; BEACH, M.C., et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: A systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v.122, p.1332–1342, 2008.

AKAHASHI, E.K. **Haplótipos do alelo β S em pacientes portadores de traço falciforme**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, 2005. 146p.

TANGPHAO, O.; CHALON, S.; MORENO, H. JR., HOFFMAN, B.B.; BLASCHKE, T.F. Pharmacokinetics of L-arginine during chronic administration to patients with hypercholesterolaemia. **Clin. Sci. (Lond)**, v.96, n.2, p.199-207, 1999.

TAYLOR, J.G.; NOLAN, V.G.; MENDELSON, L.; KATO, G.J.; GLADWIN, M.T. & STEINBERG, M.H. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with infrequent vasoocclusive pain. **PLoS ONE**, v. 3, p. e2095, 2008.

THASSILA, N. P. et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. **Adv. Biosc. Biotechnol.**, v. 4, p. 6-12, 2013.

THEIN, S.L.; MENZEL, S.; PENG, X.; BEST, S. et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 11346–11351, 2007.

THEIN, S.L.; MENZEL, S.; LATHROP, M.; GARNER, C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Hum. Mol. Genet.**, v. 18(R2), p.R216-23, 2009.

TUDER, R.M.; COOL, C.D.; YEAGER, M, et al. The Pathobiology of hyperthension. **Endothelium. Clin. Chest Med.**, v.22, n. 3, p. 405-418, 2001.

UDA, M.; GALANELLO, R., SANNA, S. et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobina and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.5, n. 5, p. 1620-1625, 2008.

UZUNOVA, V. V.; PAN, W.; GALKIN, O.; VEKILOV, P. G. Free heme and the polymerization of sickle cell hemoglobin. **Biophys. J.** v.99, p. 1976–1985, 2010.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B.A.; ZANETTE, A.M.; REIS, M.G.; BARRAL-NETTO, M.; GONCALVES, M.S. Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. **Ann. Hematol.**, v.89, n.9, p. 877-882, 2010.

WOOD, K.C.; GRANGER, D.N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.34, n. 9, p.926-932, 2007.
WOOD, K.C.; HSU, L.L.; GLADWIN, M.T. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. **Free Radic. Biol. Med.**, v.44, n.8, p.1506-1528, 2008.

WONKAM, A.; NGO BITOUNGUI, V.J.; VORSTER, A.A.; RAMESAR, R.; COOPER, R.S.; TAYO, B.; LETTRE, G.; NGOGANG, J. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. **PLoS One.** , v.9, n.3, p.e92506, 2014.

WU G, MORRIS SM, JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem. J.**, v.15, n.336 (Pt 1), p.1-17. 1998

XU, W.; KANECO, F.T.; ZHENG. S, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. **Faseb J.**, v.18, n.14, p.1746- 1748, 2004.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3 p. 207-14, 2007.

ZAMARO, P.J.A.; HIDALGO, C.A.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 25, n. 4, p.223-229, 2003.

ANEXO A



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO
EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Modulação genética, do BCL11A no perfil inflamatório, hemolítico, estresse oxidativo e nos níveis de hemoglobina fetal em pacientes com Anemia Falciforme” que acontecerá nos pacientes que são acompanhados no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) com o objetivo de entender melhor as diferentes manifestações da doença.

A participação do (a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que o Sr.(a) autorize a obtenção de 2 (DUAS) amostras de sangue para que a pesquisa seja realizada. A coleta de sangue será realizada no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). A participação na pesquisa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. O senhor (a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado, endereço para contato: Rua Tomais Acioli, nº 1620, Apto 902. Bairro Dionízio Torres. Telefone 85-96126060. Se o Senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HUWC- Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx)85 3366-8589- E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso o Senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidos para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor (a) concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/ representante legal

Data: / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: / /

ANEXO B

Figura 13. Amplificação de todos os alelos dos SNPs rs1186868, rs4671393 e rs7557939 do gene BCL11A em experimento único

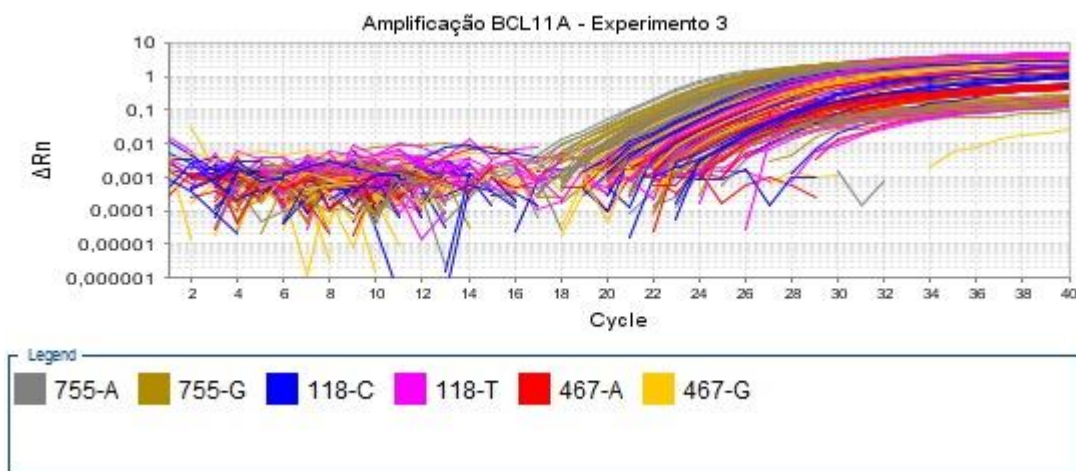


Figura 14. Discriminação alélica para o SNP rs1186868 do gene BCL11A em pacientes com AF em experimento único.

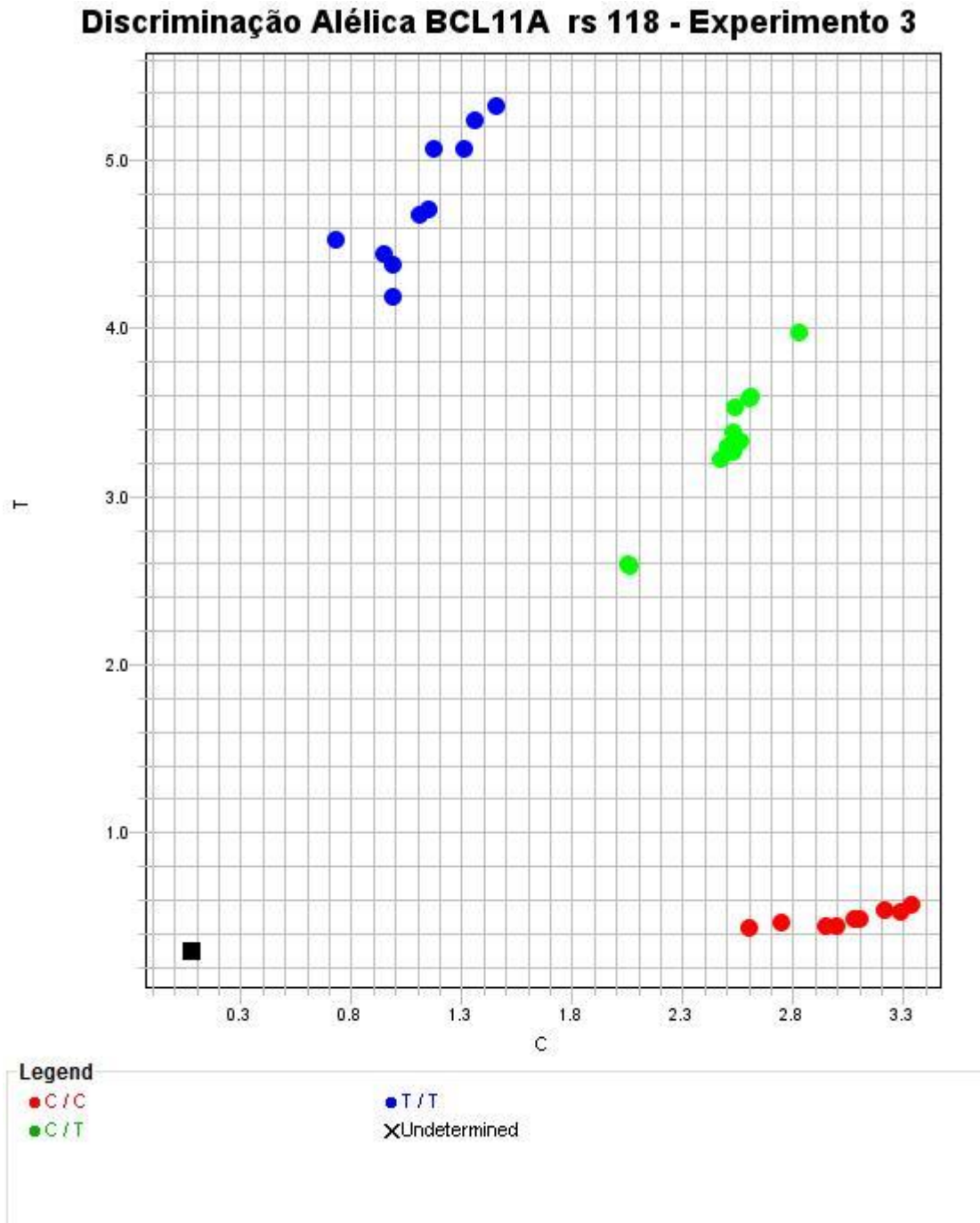


Figura 15. Discriminação alélica para o SNP rs4671393 do gene BCL11A em pacientes com AF em experimento único.

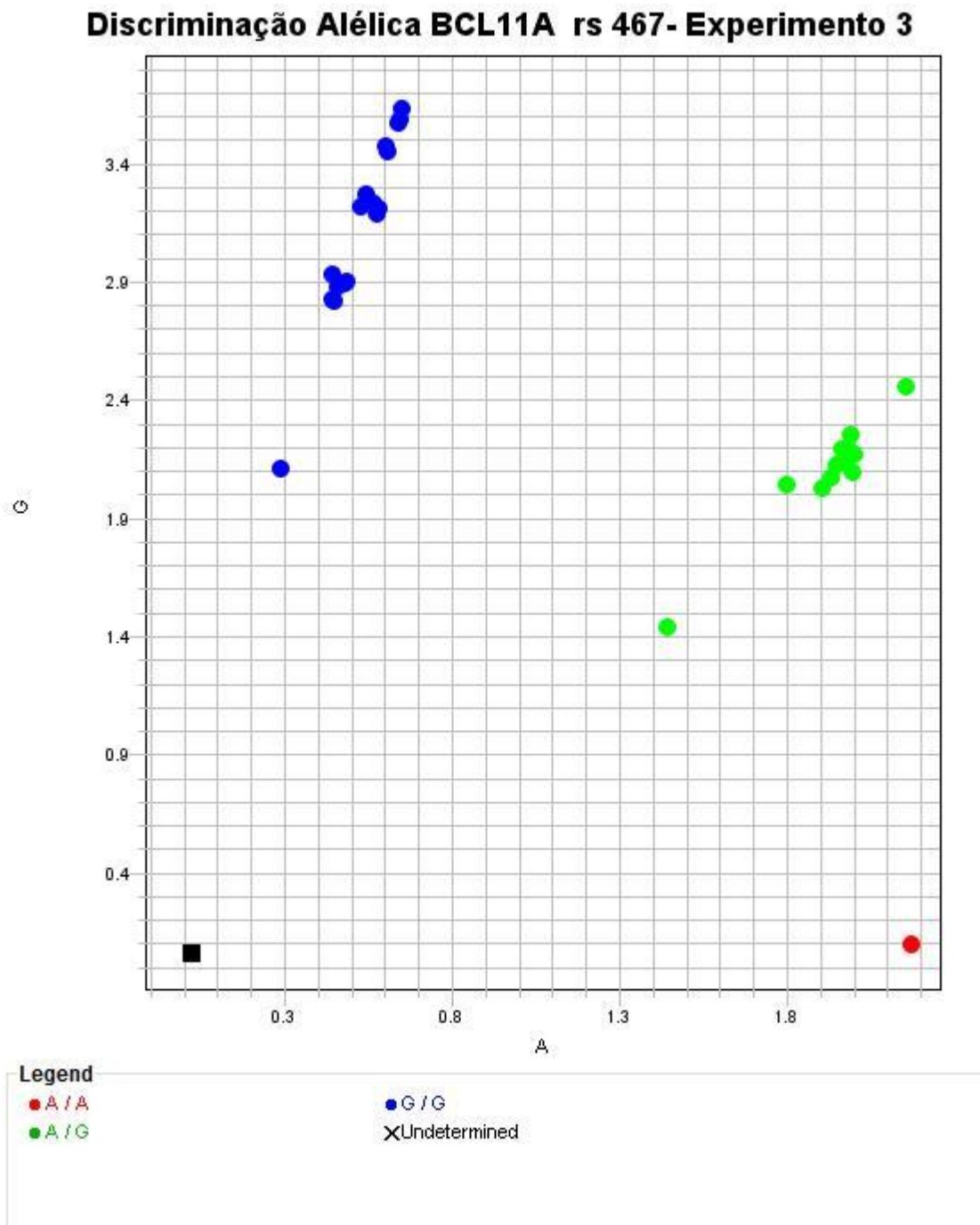


Figura 16. Discriminação alélica para o SNP rs7557939 do gene BCL11A em pacientes com AF em experimento único.

