



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

MARÍLIA ROCHA LAURENTINO

**RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *BCL11A* E BIOMARCADORES
DE HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

FORTALEZA

2016

MARÍLIA ROCHA LAURENTINO

RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *BCL11A* E BIOMARCADORES DE
HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

FORTALEZA

2016

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

-
- L413r Laurentino, Marília Rocha.
 Relação entre polimorfismos do gene *BCL11A* e biomarcadores de hemólise em pacientes com anemia falciforme / Marília Rocha Laurentino. – 2016.
 55 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2016.
 Área de Concentração: Patologia.
 Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
1. Anemia Falciforme. 2. Hemólise. 3. Polimorfismo Genético. I. Título.

CDD 616.1527

MARÍLIA ROCHA LAURENTINO

RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DO GENE *BCL11A* E BIOMARCADORES DE
HEMÓLISE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Patologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado
Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria José Rocha e Wilson Laurentino e à minha irmã Patrícia Rocha por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu esposo Jônatas Catunda pela paciência, companheirismo, compreensão e conselhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Romélia pelos conhecimentos prestados para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, pela excelente convivência e pela diversão proporcionada.

À Profa. Caroline pelo tempo disponibilizado e auxílio na elaboração deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Ajax, Profa. Cristiane e Dra. Rosângela pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos funcionários do HEMOCE pela disponibilidade e ajuda nas coletas de sangue

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

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” .

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica causada por uma mutação pontual no gene da β -globina. A hemoglobina S (HbS) gerada devido à mutação forma hemácias com menor meia-vida devido à sua destruição crônica, sendo a principal responsável pelos sinais e sintomas da doença. Os polimorfismos do gene *BCL11A* e o uso de hidroxiuréia (HU) modulam a concentração de hemoglobina fetal (HbF), principal inibidora da polimerização da HbS, diminuindo a hemólise e a vaso-occlusão. O presente estudo teve o objetivo de associar os polimorfismos do gene *BCL11A* com os biomarcadores de hemólise reticulócitos, bilirrubinas, ácido úrico, lactato desidrogenase (LDH), e metemoglobina (MetHb). Participaram do estudo 45 pacientes com AF em uso de HU, de ambos os sexos, atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza-Ceará e 80 indivíduos saudáveis como grupo controle. A dosagem de MetHb, de ácido úrico e bilirrubinas foi realizada através de método espectrofotométrico, a de LDH por método cinético, a contagem de reticulócitos por metodologia manual e a avaliação dos polimorfismos do *BCL11A* por PCR em tempo real. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism. O nível de significância foi estabelecido em <5%. Pacientes com AF e indivíduos saudáveis apresentaram uma diferença entre os parâmetros hematológicos hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e plaquetas. Em relação aos parâmetros de hemólise, observou-se que os pacientes com AF apresentaram um aumento de reticulócitos, MetHb, LDH e bilirrubinas (BT, BD, BI) em relação ao grupo controle. A região rs7557939 do gene *BCL11A* apresentou uma associação com os biomarcadores de hemólise MetHb e LDH e a região rs4671393 com a concentração de HbS. O uso da HU em doses maiores que 10mg/kg/dia e por um período maior que 50 meses apresentou associação com a diminuição da concentração de LDH e com a contagem de reticulócitos. Concluiu-se que polimorfismos no gene *BCL11A* e o tratamento com a HU podem modular os biomarcadores de hemólise, entretanto, mais pesquisas são necessárias para estudar indicadores de prognóstico e os fatores envolvidos na heterogeneidade clínica da AF.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Hemólise. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a hematological disease caused by a point mutation in the β -globin gene. Sickle hemoglobin (HbS) is generated due to fragile mutation that decreases the red blood cell lifetime due to its chronic destruction, being the main responsible for the signs and symptoms of the disease. The use of hydroxyurea (HU) and genetic polymorphisms on modulates fetal hemoglobin (HbF), the main inhibitor of HbS polymerization, reducing hemolysis and vaso-occlusion. This study aimed to evaluate the association of polymorphisms *BCL11A* gene on the hemolysis markers reticulocytes, bilirubin, uric acid, lactate dehydrogenase (LDH) and methemoglobin (MetHb). The study included 45 patients with SCD of both sexes, in use of HU, attended in outpatient University Hospital Walter Cantídio (HUWC) in Fortaleza, Ceará, and 80 healthy individuals as a control group. The MetHb, uric acid and bilirubin dosage has performed by spectrophotometric method, the LDH by a kinetic method, the reticulocyte count by manual method and evaluation of *BCL11A* polymorphisms by PCR in real time. Data were analyzed using the statistical software GraphPad Prism. The level of significance was set at <5%. Patients with SCD and healthy subjects showed a difference between hematological parameters, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV) and platelets. Regarding the hemolysis parameters, it was observed that SCD patients has an increase of reticulocytes, MetHb, LDH and bilirubins compared to control group. The rs7557939 region showed an association with hemolysis biomarkers MetHb and LDH and rs4671393 region with the HbS concentration. The use of HU at doses higher than 10 mg/kg/day and for a longer period than 50 months had association with the decrease of the LDH concentration and the reticulocyte count. We conclude that polymorphisms on *BCL11A* gene and treatment with HU may modulate the hemolysis biomarkers, however, more research is necessary to study prognostic indicators and the factors involved in the clinical heterogeneity of SCD.

Keywords: Sickle cell disease. Hemolysis. Genetic polymorphism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Mutação no gene da β -globina.....	15
Figura 2	– Mutação na β -globina e fisiopatologia da AF.....	16
Figura 3	– Concentração de reticulócitos, MetHb, LDH, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI) entre os genótipos da região rs7557939 do gene <i>BCL11A</i>	33
Figura 4	– Concentração de reticulócitos, MetHb, LDH, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI) entre os genótipos da região rs4671393 do gene <i>BCL11A</i>	34
Figura 5	– Concentração de reticulócitos, MetHb, LDH, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI) entre os genótipos da região rs11886868 do gene <i>BCL11A</i>	36
Figura 6	– Concentração de HbF entre os genótipos das regiões rs7557939, rs4671393 e rs1186868 do gene <i>BCL11A</i>	37
Figura 7	– Concentração de HbS entre os genótipos das regiões rs7557939, rs4671393 e rs1186868 do gene <i>BCL11A</i>	37
Figura 8	– Concentração de reticulócitos, MetHb, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI), LDH entre diferentes dose de HU.....	38
Figura 9	– Concentração de reticulócitos, MetHb, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI), LDH em relação ao tempo de uso de HU.....	39
Figura 10	– Associação das regiões do <i>BCL11A</i> com a dose de HU utilizada.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Polimorfismos e regiões do gene <i>BCL11A</i> estudadas.....	28
Tabela 2	– Reagentes utilizados na PCR alelo específica em tempo real.....	29
Tabela 3	– Características e dados do hemograma de pacientes com AF e grupo controle.....	31
Tabela 4	– Concentração de reticulócitos, MetHb, ácido úrico, LDH e bilirrubinas (BT, BD, BI) em pacientes com AF e grupo controle.....	32
Tabela 5	– Frequência alélica de acordo com as regiões do gene <i>BCL11A</i> estudadas.....	32
Tabela 6	Frequência dos genótipos do gene <i>BCL11A</i> de acordo com as regiões estudadas.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HbS	Hemoglobina S
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HU	Hidroxiuréia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
LACEN	Laboratório Central do Estado do Ceará
LDH	Lactato Desidrogenase
LPDGH	Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas
MetHb	Metemoglobina
NO	Óxido nítrico
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
QTL	Quantitative Trait Locus
SNP	Polimorfismos de Nucleotídeos Simples
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

β	beta
Fe^{2+}	Ferro ferroso
Fe^{3+}	Ferro férrico
O_2	Oxigênio
γ	Gama
®	Marca Registrada
MgCl_2	Cloreto de magnésio
%	Porcentagem
mg	Miligrama
dL	Decilitro
fL	Fentolitro
g	Gramma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Hemoglobinopatias	14
1.2	Anemia Falciforme	14
1.3	Epidemiologia	15
1.4	Fisiopatologia	15
1.5	Hemólise	17
1.6	Manifestações clínicas	19
1.7	Tratamento	19
1.8	Biomarcadores de prognóstico	21
1.8.1	<i>Hemoglobina fetal</i>	21
1.8.2	<i>Haplótipos do gene da β-globina S</i>	21
1.8.3	<i>Polimorfismos do gene BCL11A</i>	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Aspectos éticos	25
3.2	Desenho do estudo	25
3.3	Local do estudo	25
3.4	Casuística	25
3.5	Seleção da amostra	26
3.6	Coleta do material	26
3.7	Dosagem dos biomarcadores de hemólise	27
3.7.1	<i>Dosagem de metemoglobina</i>	27
3.7.2	<i>Dosagem de LDH, ácido úrico e bilirrubinas (total e direta)</i>	27
3.7.3	<i>Contagem de reticulócitos</i>	28
3.8	Extração de DNA	28
3.9	Determinação dos polimorfismos em BCL11A	28
4.0	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	31

5	DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	54
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	56

1 INTRODUÇÃO

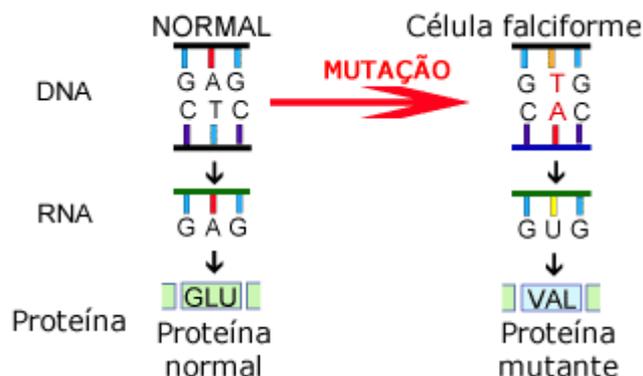
1.1 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias constituem um grupo de distúrbios hemolíticos herdados de forma recessiva que alteram a estrutura ou a síntese da hemoglobina. Compreendem as talassemias, a doença falciforme (DF), as hemoglobinas instáveis e as hemoglobinas variantes com alterações funcionais. Podem ser classificadas em dois grandes grupos: alterações que resultam de uma anormalidade estrutural em uma das cadeias da globina, como no caso da DF, e alterações quantitativas na produção de cadeias globínicas, grupo que inclui as talassemias (ORLANDO *et al*, 2000; NAOUM, BONINI-DOMINGOS, 2007).

A DF compreende um grupo de doenças que possuem em comum a presença da hemoglobina S (HbS), podendo ser em homozigose, como no caso da anemia falciforme (AF- HbSS), em associações com outras variantes de hemoglobinas, tais como, HbD, HbC, entre outras, e interações com as talassemias. A heterozigose para HbS (traço falciforme-HbAS) define uma situação relativamente comum, em que o indivíduo apresenta a mutação, porém sem sintomatologia clínica (CANÇADO, JESUS, 2007; JESUS, 2010).

1.2 Anemia Falciforme

A AF é uma doença hematológica genética que apresenta uma mutação pontual no cromossomo 11 no gene da β -globina. Tal mutação modifica a sequência do códon GAG para GTG, devido a uma troca entre as bases nitrogenadas adenina e timina. Em decorrência dessa troca, há uma modificação no 6º aminoácido da cadeia da β -globina, sendo produzido um ácido glutâmico no lugar da valina, gerando uma hemoglobina variante denominada HbS em homozigose (Figura 1). Essa pequena modificação estrutural é responsável por profundas alterações nas propriedades físico-químicas da molécula de hemoglobina no estado desoxigenado (STUART; NAGEL, 2004; MANFREDINI *et al*, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

Figura 1 – Mutação no gene da β -globina

Nota: Esquema mostra a alteração genética na AF. A mutação é do tipo pontual no gene da β -globina, localizada no cromossomo 11.

Fonte: Disponível em: <http://www.ib.usp.br/evosite/evo101/IIC2aCasestudy.shtml>

1.3 Epidemiologia

A HbS é uma hemoglobina variante originária da África, que chegou ao Brasil com o tráfico de escravos negros. Trata-se da doença hereditária mais frequente no mundo. Durante muitos anos foi reconhecida como uma doença predominante em negros e pardos, entretanto, encontra-se hoje também em brancos em função da miscigenação (GALIZA NETO, PITOMBEIRA, 2003).

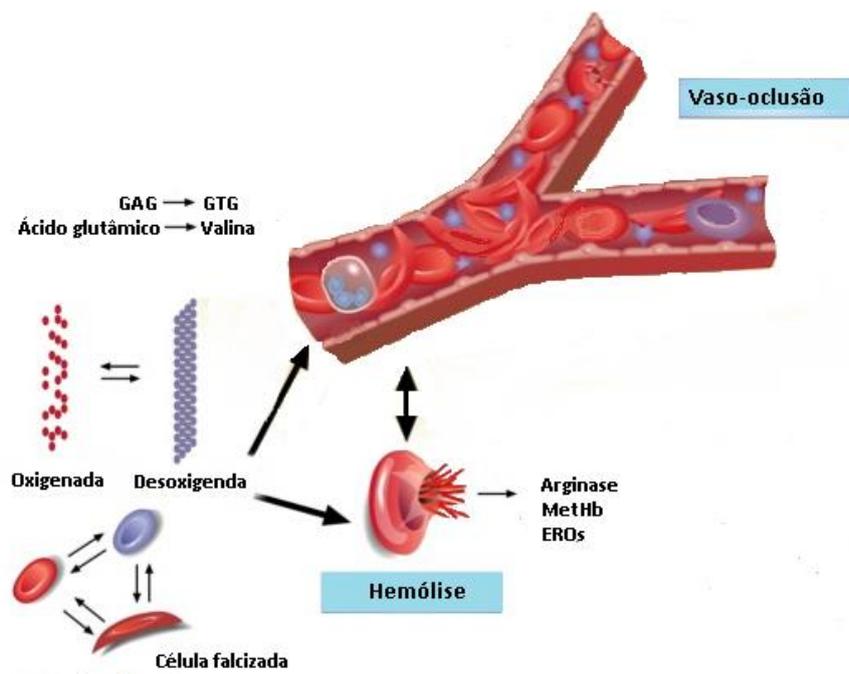
No Brasil, distribui-se heterogeneamente, sendo mais frequente onde a proporção de afrodescendentes é maior. Estima-se que 25 mil a 50 mil pessoas tenham a doença no país (SAÚDE, 2015). A HbS apresenta maior frequência na região Nordeste, principalmente no Estado da Bahia, onde a ancestralidade africana tem maior predominância genética, com incidência de 1/650 em recém-nascidos (SAÚDE, 2014; CARVALHO *et al*, 2014).

1.4 Fisiopatologia

Quando a HbS apresenta-se na forma desoxigenada, torna-se alongada e as cadeias de $\beta 1$ e $\beta 2$ das globinas βS ficam mais próximas, favorecendo o contato entre as regiões da desoxiemoglobina. Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS, forma-se um número considerável de moléculas que se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, formando feixes, os quais modificam a arquitetura e flexibilidade do eritrócito, que adquire a forma “de foice” característica da doença. As modificações que

ocorrem no interior da célula devido ao processo de falcização levam à múltiplos eventos, dentre os principais a vaso-oclusão e a hemólise (Figura 2) (STUART; NAGEL, 2004; ZAGO; PINTO, 2007; OWUSU-ANSAH *et al*, 2016).

Figura 2– Mutação na β -globina e fisiopatologia da AF



Nota: O esquema representa a HbS passando do estado oxigenado para o desoxigenado, fato constante na fisiopatologia das hemácias, sendo nesse caso representado pelas mudanças físico-químicas que ocorrem de forma contínua e crônica, alterando a forma da hemácia de bic ncova para “foice” e comprometendo tanto a meia vida da célula como sua circulação normal. O processo de falcização induz hemólise e episódios de vaso-oclusão de natureza bem variável nesses pacientes.

Fonte: Disponível em: <<http://murphylaboratory.com/?p=491>> (adaptado).

Dentre os eventos ocorridos na AF, a baixa biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), tanto em crianças como em adultos, em estado basal ou durante as crises vaso-oclusivas, já foi documentado na literatura. Além disso, o aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial como VCAM-1 e ICAM-1 e a migração de leucócitos e plaquetas para o microambiente inflamatório, leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxig nio (ERO) que culminam em um aumento do estresse oxidativo, inflamação crônica aos pacientes e um quadro pr -coagulante (KATO *et al.*, 2009).

As hemácias falcizadas, por serem mais rígidas, ao passarem no interior de pequenos vasos, ocasionam dano à parede do endotélio e liberação de endotelina-1, um potente vasoconstritor. Este fato, juntamente com a diminuição da biodisponibilidade do

NO (devido ao consumo de seu precursor pela enzima arginase), e a adesão de hemácias, leucócitos e plaquetas ao endotélio, diminuem a luz do vaso e causam os fenômenos vaso-oclusivos, que juntamente com a hemólise crônica, contribuem para o aparecimento das manifestações clínicas da doença (ZAGO; PINTO, 2007; HOPPE, 2014; WAGENER *et al*, 2015; OWUSU-ANSAH *et al*, 2016).

1.5 Hemólise

A hemólise constitui a destruição prematura dos glóbulos vermelhos do sangue, por rompimento fisiológico ou patológico da membrana plasmática. A hemólise crônica pode ocorrer em várias condições, causando anemia hemolítica (CERQUEIRA *et al*, 2010).

NA AF a hemólise crônica causa desequilíbrio vascular, com diminuição da meia-vida das hemácias, refletindo na concentração de hemoglobina, contagem de reticulócitos, alterações nos níveis de bilirrubinas e LDH e, devido a isso, esses parâmetros tem sido estudados como forma de avaliar e monitorar a evolução da doença, sendo utilizados na prática clínica. Outros parâmetros como a dosagem de ácido úrico e de metemoglobina (MetHb) não são utilizados clinicamente para essa finalidade e ainda estão sendo estudados em pesquisas científicas (NOLAN *et al*, 2005; CERQUEIRA *et al*, 2010).

O grau de hemólise varia de acordo com o tipo de DF, sendo mais grave em pacientes com AF, que são homozigotos para a mutação do gene da β -globina (HbSS), e menos graves em indivíduos portadores de dupla heterozigose ou associação com talassemia (NAOUM; SOUZA, 2004; SILVA FILHO *et al.*, 2005; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; CERQUEIRA *et al*, 2010).

O quadro de hemólise em pacientes com AF é associado com a evolução da doença, portanto, o uso de biomarcadores de hemólise tem sido utilizados na prática clínica, como monitoramento do tratamento em pacientes com AF, apesar do grande uso da dosagem da HbF como modulador da atividade da doença (SILVA FILHO *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al*, 2010).

A contagem de reticulócitos fornece uma estimativa da atividade da medula óssea, sendo utilizado no diagnóstico diferencial das anemias e no monitoramento do tratamento das mesmas. Estudos mostram um aumento da contagem de reticulócitos em pacientes com AF, estando este parâmetro associado ao aumento do processo hemolítico

e à uma diminuição desse parâmetro com o uso da HU (BRUGNARA *et al*, 1997; RILEY; BEN-EZRA; TIDWELL, 2001; DAMANHOURI *et al*, 2015; MOREIRA *et al*, 2015).

A MetHb é liberada durante o processo de hemólise, se apresentando em quantidade elevada em pacientes com AF, como foi verificado em alguns estudos. A MetHb é a forma oxidada da hemoglobina cujo ferro ferroso (Fe^{2+}) da porção heme está oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}) e, por isso, não consegue se ligar ao oxigênio. A metemoglobinemia pode ocorrer por um desequilíbrio redox, devido a oxidação excessiva da hemoglobina, ou pela diminuição da atividade das enzimas redutoras (NAOUM; SOUZA, 2004; SILVA FILHO, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008; LAURENTINO *et al*, 2014; JIALAL; SOKOLL, 2015).

Lactato desidrogenase (LDH) é uma das enzimas da via glicolítica que catalisa a conversão do piruvato em lactato. A LDH sérica existe na forma de 5 isoenzimas que são numeradas de 1 a 5 de acordo com a sua mobilidade eletroforética. A distribuição das isoenzimas não é uniforme entre os tecidos, sendo encontrada nas hemácias principalmente nas formas LDH1 e LDH2. Juntamente com a contagem de reticulócitos e bilirrubina indireta, a LDH tem sido utilizada como um marcador de hemólise e é elevada em pacientes com AF em estado estacionário. Elevadas concentrações de LDH tem sido correlacionadas com o aumento da incidência de priapismo e úlceras de perna na AF. (REES; GIBSON, 2011; BALLAS, 2013; DAMANHOURI *et al*, 2015; MOREIRA *et al*, 2015)

O ácido úrico é uma substância formada pelo organismo através da decomposição das purinas. O aumento da concentração sérica de ácido úrico pode ocorrer devido ao aumento da síntese de nucleoproteínas ou à diminuição na excreção renal. Na AF a hiperuricemia pode ocorrer devido à alteração da função tubular renal ou à reutilização de ácidos nucleicos provenientes da hemólise (DIAMOND; MEISEL; HOLDEN, 1979; CONGER, 1990; MOREIRA *et al*, 2015). No estudo de Cerqueira e colaboradores (2011), encontrou-se uma correlação entre níveis de ácido úrico e marcadores de hemólise e no estudo de Moreira e colaboradores (2015) observou-se um aumento nas dosagens de ácido úrico em pacientes com AF em relação à indivíduos saudáveis.

Pacientes com AF apresentam um processo hemolítico crônico decorrente da destruição prematura das hemácias. Icterícia é frequentemente observada nestes doentes e

reflete a presença de hiperbilirrubinemia, principalmente às custas de bilirrubina indireta (não-conjugada). A intensidade da icterícia varia muito entre os doentes, e isto pode ser explicado pelo grau de comprometimento hepático, intensidades diferentes de hemólise e alterações genéticas do metabolismo da bilirrubina. No citoplasma dos macrófagos, a hemoglobina é degradada em globina e heme. O heme sofre a ação da enzima heme-oxidase, que abre o anel tetrapirrólico da porfirina, liberando o ferro, uma molécula de monóxido de carbono, além de biliverdina. Esta última sofre ação da enzima biliverdina-reductase e passa a bilirrubina, um pigmento amarelo. Em estudo realizado por Belini Junior e colaboradores (2015) demonstrou-se que pacientes com AF em uso de hidroxiuréia (HU) apresentaram diminuição de bilirrubina total, além de uma associação deste marcador com a gravidade da doença.

1.6 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da AF são heterogêneas e de causas multifatoriais, variando de sintomatologia leve à grave, podendo comprometer órgãos vitais como pulmão, coração e rins. A vaso-oclusão em pequenos vasos representa o evento determinante na doença, podendo provocar isquemia de tecidos, resultando em uma cascata de eventos tais como: hemólise, a disfunção endotelial, a inflamação, hipercoagulabilidade, o estresse oxidativo, lesão de reperfusão e hipoxemia. Dentre os eventos mais graves podemos citar a síndrome torácica aguda (STA), insuficiência renal, acidente vascular cerebral (AVC), priapismo, infecções recorrentes e hipertensão pulmonar (ZAGO; PINTO, 2007; REES; GIBSON, 2011).

1.7 Tratamento

O tratamento da AF consiste no uso de vários medicamentos, incluindo analgésicos, antibióticos, vitaminas e antioxidantes com a finalidade de reduzir os sinais e sintomas da doença. Além disso, pode ser utilizado a transfusão sanguínea nos casos de anemia grave e o uso de hidroxiuréia (HU), com o objetivo de aumentar a concentração de HbF. O transplante de células-tronco hematopoéticas consiste no único tratamento curativo para a doença (IANNONE *et al.*, 2005).

A HU é o medicamento de escolha para o tratamento tanto de crianças como de adultos com AF. Atualmente o uso não segue um critério de padronização. Os

primeiros estudos do uso da HU na AF se iniciaram nos anos 70, mas somente na década de 90, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a sua utilização para o tratamento da AF em pacientes adultos com crises dolorosas recorrentes. No Brasil, o uso da HU para pacientes com DF foi aprovado em novembro de 2002, através da portaria de número 872 do Ministério da Saúde (CANÇADO *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2014).

A HU além de promover um aumento na concentração de HbF, inibindo a polimerização da HbS, atua também na redução da expressão de moléculas de adesão, com propriedades anti-inflamatória e anti-agregante, contribuindo para a diminuição da STA, das crises vaso-oclusivas, reduzindo a necessidade de transfusões sanguíneas, a frequência de hospitalizações e a mortalidade. Estudos atribuem ainda à droga uma ação no metabolismo do NO, aumentando a produção do mesmo, via ciclo da GMPc e consequentemente aumento da HbF (HUANG *et al.*, 2004; STROUSE, 2008; WONG *et al.*, 2014).

O benefício principal do tratamento com HU em pacientes falcêmicos é atribuído à propriedade da mesma de elevar os níveis de HbF, sendo um importante inibidor da polimerização da HbS, contribuindo para a diminuição da hemólise, e reduzindo a gravidade e intensidade das manifestações clínicas (FIGUEIREDO, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

Os pacientes em uso de HU podem apresentar uma variabilidade na resposta terapêutica, uma vez que esta está interligada com os moduladores da gravidade clínica da AF, dentre eles a concentração de HbF, grupos de haplótipos da β - globina, a co-associação com alfa-talassemia e presença dos polimorfismos como os *XmnI*, *BCL11A* e *HBSIL-MYB* 3. Além disso, a variabilidade da resposta pode estar ainda associada à variação da metabolização do fármaco (LETTRE *et al.*, 2008; IOLASCON; ANDOLFO; RUSSO, 2015).

Estudos em farmacogenética tem identificado que polimorfismos genéticos em regiões variadas podem interferir na variabilidade da resposta ao tratamento com a HU, causando eficácia diferenciada entre os pacientes. O conhecimento à cerca dos polimorfismos em regiões da γ -globina é essencial para o entendimento da heterogeneidade clínica da AF e para o desenvolvimento de terapias alvo ou até mesmo

personalizada para cada indivíduo, melhorando a resposta ao tratamento e minimizando os eventos adversos e o risco de toxicidade da droga (XIE; FRUEH, 2005; MA; LU, 2011; SIM; KACEVSK; INGELMAN-SUNDBERG, 2013; IOLASCON; ANDOLFO; RUSSO, 2015).

1.8 Biomarcadores de prognóstico

Pacientes com AF apresentam grande variabilidade clínica, apesar de todos possuírem a mesma mutação genética. Essa diferença na gravidade clínica deve-se à efeitos ambientais e à moduladores como a concentração de HbF, a associação com a alfa-talassemia e os haplótipos da β -globina (ZAGO; PINTO, 2007; STEINBERG, 2009).

1.8.1 Hemoglobina fetal

As elevações de HbF tem um papel muito importante na modulação do quadro da AF, sendo o mais importante modulador da doença. Elevadas concentrações desta hemoglobina, em geral, reduzem a gravidade da doença pois diluem a concentração de HbS circulante, inibindo sua polimerização. Assim, genótipos que produzem uma menor concentração de HbS ou uma elevação de HbF (que não interage com as moléculas de HbS) dificultam a polimerização e a falcização, reduzindo a gravidade e intensidade das manifestações clínicas (STUART; NAGEL, 2004; ZAGO; PINTO, 2007; STEINBERG, 2009; ORKIN. HIGGS, 2010; BHANUSHALI, 2015).

1.8.2 Haplótipos do gene da β -globina S

Os haplótipos da β S representam padrões de polimorfismos do DNA ao longo do cromossomo 11 de indivíduos portadores do gene da β -globina. Cinco principais haplótipos têm sido relatados em diferentes regiões do mundo e são relacionados com os locais de sua origem: Benin, Bantu, Senegal, Camarões e Árabe Indiano (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; FLEURY, 2007).

A descoberta dos haplótipos do gene β S apresentou-se como importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elementos de estudo clínico, podendo fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e seu nível de gravidade, visto que modificam o sítio polimórfico *Xmnl*, na região promotora do gene da γ -globina, estando relacionados com quadro clínico e níveis de HbF variados (ELDERDERY *et al*, 2012). O haplótipo Senegal está associado a níveis

elevados de HbF e curso clínico menos grave da doença; o Benin, a níveis medianos de HbF e curso clínico intermediário; o Bantu a níveis diminuídos de HbF e quadro clínico mais grave; e o haplótipo Árabe-Indiano apresenta níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo. No Nordeste do Brasil há maior prevalência dos haplótipos Bantu e Benin. (ZAGO; PINTO, 2007; SILVA, GONÇALVES; RABENHORST, 2009).

1.8.3 Polimorfismos do gene *BCL11A*

A concentração de HbF em adultos é herdada como uma característica genética quantitativa. Estudos tem mostrado que polimorfismos no gene promotor *Gγ-globin* (*HBG2*) (cromossomo 11p), no gene *BCL11A* (cromossomo 2p) e na região intragênica *HBSIL-MYB* (cromossomo 6q) estão associados a diferentes variações na concentração de HbF na AF. Dos três *Quantitative Trait Locus* (QTL), *BCL11A* tem sido mais fortemente correlacionado à expressão de HbF (CARDOSO *et al*, 2014; BHANUSHALI, 2015).

Indivíduos apresentam variada concentração de HbF e esta é uma característica altamente hereditária, portanto era esperado que a identificação de polimorfismos genéticos que modulam a HbF fossem importantes para elucidar os mecanismos moleculares da expressão de HbF e a etiologia da heterogeneidade clínica da AF. Os níveis de HbF são controlados por um certo número de determinantes genéticos, resultando em concentrações variáveis desta hemoglobina, levando à variabilidade fenotípica observada na AF (LETTRE *et al*, 2008).

Estudos genéticos mostraram a presença de Polimorfismos de Nucleotídeos Simples (SNPs) que ocorrem em mais de 1% da população e que são responsáveis por 20 a 50% das modificações nos níveis de HbF em pacientes com AF ou β -talassemia e indivíduos normais. Esses polimorfismos ocorrem no gene *BCL11A*, que está localizado no cromossomo 2 (2p16) e que codifica um fator transcricional que modula a síntese de HbF (expressão de γ -globina). O gene *BCL11A* age naturalmente como um repressor da expressão de HbF, entretanto, polimorfismos nessa região levam ao aumento da expressão de HbF (FANIS *et al*, 2014; BHANUSHALI *et al*, 2015; BITOUNGUI; NGOGANG; WONKAM, 2015).

Diversas pesquisas mostram a relação entre as concentrações de HbF e os polimorfismos do gene *BCL11A*. Segundo estudos, as regiões do gene *BCL11A* mais

implicadas na modulação da expressão da HbF são rs1186868, rs7557939 e rs4671393, entretanto, ainda não existe um consenso em relação à região ou o polimorfismo que mais estaria relacionado com diferenças na concentração de HbF (UDA *et al*, 2008; LETTRE *et al*, 2008; CHAOUCH *et al*, 2015).

Trabalhos diversificados vem mostrando a associação existente entre o gene *BCL11A* e a concentrações de HbF, entretanto, são escassos os estudos que sugerem a influência desse gene sobre os parâmetros hemolíticos. Dentro desse contexto, buscou-se verificar uma possível associação existente entre os polimorfismos do gene *BCL11A* e biomarcadores de hemólise na AF.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação dos polimorfismos do gene *BCL11A* com os biomarcadores de hemólise reticulócitos, bilirrubinas, ácido úrico, lactato desidrogenase e metemoglobina em pacientes com anemia falciforme.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil demográfico dos pacientes com AF através das variáveis sexo e idade e o perfil hematológico através da análise dos parâmetros Hb, Ht, VCM, CHCM, leucócitos, plaquetas, concentração de HbF e de HbS.
- Comparar a concentração dos biomarcadores de hemólise metemoglobina (MetHb), bilirrubinas, ácido úrico, lactato desidrogenase (LDH) e reticulócitos entre pacientes com AF e um grupo de indivíduos saudáveis.
- Determinar a presença dos polimorfismos do gene *BCL11A* nos pacientes com AF.
- Associar os polimorfismos do gene *BCL11A* com as concentrações dos biomarcadores de hemólise em pacientes com AF.
- Verificar a associação dos polimorfismos do gene *BCL11A* com as concentrações de HbF e de HbS.
- Comparar a concentração dos biomarcadores de hemólise em pacientes com AF em relação à dosagem utilizada e ao tempo de tratamento com HU.
- Associar as dosagens de HU com os genótipos do gene *BCL11A*.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o nº de protocolo 706.154 (ANEXO A). O trabalho em questão está englobado em um projeto maior que abrange esta pesquisa e seus respectivos objetivos. O trabalho foi 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.

3.2 Desenho do estudo

Estudo do tipo transversal em que foram incluídos pacientes com diagnóstico de AF atendidos no ambulatório do HUWC. O estudo foi realizado no período de junho de 2014 a janeiro de 2016.

3.3 Local do estudo

A coleta das amostras de sangue periférico dos pacientes com AF foi realizada no ambulatório de Hematologia do HUWC (localizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará -HEMOCE) no período de janeiro a dezembro de 2015. Os parâmetros de hemólise foram realizados no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do Curso de Farmácia da UFC e os polimorfismos do gene *BCL11A* no Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN).

3.4 Casuística

Participaram do estudo 45 pacientes com AF, em uso de HU, de ambos os sexos, adultos, selecionados de acordo com os critérios de seleção da amostra. Como grupo controle foram utilizadas amostras de 80 doadores de sangue (HbAA) do HEMOCE.

Os pacientes com AF foram estratificados de acordo com a dose de HU utilizada em: <10mg/kg/dia e em \geq 10mg/kg/dia (JAIN *et al*, 2013; WONG *et al*, 2014) e de acordo com o tempo de tratamento com a HU: < 50 meses e \geq 50 meses. Em relação aos genótipos do gene *BCL11A* das regiões estudadas, os pacientes foram divididos em: A/A; A/G; G/G; C/C; C/T e T/T.

O grupo de indivíduos saudáveis (controle) foi utilizado no estudo a fim de comparar os parâmetros do hemograma e os biomarcadores de hemólise em relação aos pacientes com AF.

3.5 Seleção da amostra

Critérios de inclusão

- Pacientes com AF:

Pacientes adultos (maiores de 18 anos), de ambos os sexos, em uso de HU, com diagnóstico de AF (HbSS) previamente confirmado por estudo clínico e molecular. Os participantes do estudo apresentavam-se no estado basal da doença, segundo os critérios estabelecidos por Ballas (2012): ausência de crises dolorosas por quatro semanas consecutivas; nenhuma admissão hospitalar nos últimos 2-3 dias; histórico negativo de transfusão sanguínea durante os 4 meses anteriores; nenhuma intercorrência de infecção ou inflamação nas últimas 4 semanas; nenhum tratamento com medicamentos que possam afetar o hemograma (antibióticos, imunossupressores, entre outros) durante as últimas 3 semanas.

- Grupo controle: Indivíduos adultos (maiores de 18), de ambos os sexos, aparentemente saudáveis.

Critérios de exclusão

- Pacientes com AF:

-Pacientes em uso de vitaminas antioxidantes.

-Pacientes que não utilizavam HU

- Grupo controle:

- Indivíduos em uso de vitaminas antioxidantes.

3.6 Coleta do material

As informações demográficas, os parâmetros hematológicos e as informações sobre a HU (dose e tempo de uso), concentração de HbF e HbS foram obtidas dos prontuários dos pacientes.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – APÊNDICE A) as amostras de sangue periférico foram coletadas em dois tubos: um contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a realização da dosagem de MetHb, contagem de reticulócitos e extração de DNA leucocitário (para posterior determinação dos polimorfismos do *BCL11A*); e um tubo contendo anticoagulante heparina para a dosagem de LDH, ácido úrico e bilirrubinas.

3.7 Dosagem dos biomarcadores de hemólise

3.7.1 Dosagem de metemoglobina

A dosagem de MetHb foi realizada por método espectrofotométrico, segundo a metodologia proposta por Naoum, Radispiel e Moraes (2004). Essa técnica fundamenta-se na avaliação da solução de hemoglobina, previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mol L⁻¹ (preparada segundo Camargo *et al*, 2007) em dois comprimentos de onda específicos para metemoglobina (630 nm) e oxiemoglobina (540 nm). Utilizou-se tampão fosfato 60 mol L⁻¹ e saponina a 1% como reagentes.

A dosagem de MetHb em porcentagem é obtida através do cálculo a seguir, utilizando as absorbâncias obtidas:

$$\text{Cálculo da MetHb (\%)} = \frac{\text{Abs } 630\text{nm} \times 100}{\text{Abs } 630\text{nm} + (\text{Abs } 540\text{nm} \times 10)}$$

Para esta técnica, a porcentagem normal de MetHb situa-se entre 1,9 a 3,8%. Valores acima de 4% são considerados elevados.

3.7.2 Dosagem de LDH, ácido úrico e bilirrubinas (total e direta)

Foram realizadas utilizando-se kits específicos da marca Labtest® obedecendo a metodologia sugerida pelo fabricante. A dosagem de LDH foi realizada por modo cinético, através de metodologia UV - Método Piruvato-Lactato. A dosagem de ácido úrico foi realizada mediante sistema enzimático, utilizando metodologia colorimétrica (Enzimático Trinder). As bilirrubinas total e direta foram determinadas através de reação de ponto final, utilizando metodologia colorimétrica. Os níveis de bilirrubina indireta foram determinados a partir da subtração entre os valores de bilirrubina total e bilirrubina direta.

3.7.3 Contagem de reticulócitos

A contagem de reticulócitos foi realizada pelo método manual, utilizando a coloração supravital (DACIE; LEWIS, 1995). Esta metodologia consiste em contar em microscópio óptico a quantidade de reticulócitos obtidos dentre 1000 hemácias.

3.8 Extração de DNA

Primeiramente foi realizada a extração do DNA leucocitário a partir de amostras de sangue total colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Foram utilizados kits específicos de extração da Axygen®. Após a realização do protocolo de extração, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização.

3.9 Determinação dos polimorfismos em *BCL11A*

Após a extração do DNA, foi realizado o estudo dos polimorfismos do gene *BCL11A* através de uma reação de PCR em tempo real utilizando tecnologia TaqMan® SNP Genotyping Assay (LIFE TECHNOLOGIES). A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica na fita recém-sintetizada. As reações foram realizadas sempre em duplicata, utilizando-se o fluoróforo VIC/FAM e PCR Master Mix Universal® (LIFE TECHNOLOGIES), que contém todos os reagentes necessários para a PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, Taq Ampli-Gold). Além disso, utilizou-se também amostra de DNA e *primers* específicos para o gene analisado.

A análise dos polimorfismos no gene *BCL11A* foi realizada através da detecção das seguintes regiões do gene: rs4671393 e rs7557939, rs11886868 (Tabela 1)

Tabela 1 – Polimorfismos e regiões do gene *BCL11A* estudadas

Região	Alelo selvagem	Alelo mutante
rs4671393	A	G
rs7557939	G	A
rs11886868	C	T

As reações foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante (LIFE TECHNOLOGIES), como apresentada na Tabela 2. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz.

Tabela 2 – Reagentes utilizados na PCR alelo específica em tempo real

Reagentes	µL
Água ultrapura	7
Master Mix Universal	12,5
SNP	0,5
DNA genômico	5
Total	25

O processo de amplificação foi realizado por uma ativação prévia da enzima a 95°C por 10 minutos; acrescido de 40 ciclos compreendendo desnaturação do DNA a 92°C por 15 segundos, e anelamento e extensão (pareamento dos oligonucleotídeos) a 60°C por 1 minuto.

A detecção da amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 7500 REAL-TIME PCR SYSTEM® (APPLIED BIOSYSTEMS) 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. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente menor é o Ct.

4.0 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada mediante a utilização do programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0. Primeiramente utilizou-se o teste D'Agostino e Pearson para verificar a normalidade dos dados. Em seguida utilizou-se os

testes estatísticos de Mann Whitney (quando variáveis não paramétricas) e teste T não pareado (para variáveis paramétricas) para a comparar as médias dos biomarcadores de hemólise entre pacientes com AF e grupo controle e para comparar a concentração dos parâmetros de hemólise em relação ao tempo de uso e à dose de HU. Para a comparação dos biomarcadores entre os genótipos do *BCL11A* e a comparação da concentração de HbF e de HbS entre os genótipos do *BCL11A* utilizou a análise de variância Anova com pós teste de Tukey.

Foi utilizado o teste do Qui-quadrado para a associação entre os genótipos do *BCL11A* e a dose de HU utilizada. Foi estabelecido significância estatística quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

A população em estudo foi constituída por 45 pacientes com AF com idade variando de 20 a 65 anos, com média de 37,23 anos. Em relação ao sexo, 28 (62,2%) eram do sexo feminino e 17 (37,8%) do sexo masculino. As características demográficas e hematológicas estão apresentadas na Tabela abaixo:

Tabela 3- Características e dados do hemograma de pacientes com AF e grupo controle

	AF (n= 45)	Controle (n=80)	Valor de p
Masculino/Feminino	17/28	12/19	---
Idade (anos)	37,23 ± 14,51	28,45 ± 7,914	---
Hemoglobina (g/dL)	9,591 ± 1,461	14,18 ± 1,332	< 0,0001*
Hematócrito (%)	28,62 ± 4,813	42,50 ± 3,566	< 0,0001*
VCM (fL)	105,7 ± 13,85	82,80 ± 3,507	< 0,0001*
CHCM (%)	33,66 ± 2,383	33,36 ± 0,913	0,3080
Leucócitos (x10⁹/L)	9003 ± 4276	7490 ± 2233	0,0752
Plaquetas (x10⁶/μL)	369251 ± 113722	217122 ± 50630	< 0,0001*
HbF (%)	13,15 ± 7,807	---	---
HbS (%)	77,78 ± 11,79	---	---

Nota: AF- pacientes com AF/ VCM- Volume Corpuscular Médio/ CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média/ HbF- Hemoglobina fetal/HbS- Hemoglobina S. Os valores acima foram apresentados como Média ± desvio padrão. Valor de p obtido através do Teste t não pareado. *Significante ao nível de 0,05. Fonte: Da própria autora.

Observou-se na Tabela 3 uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre paciente com AF e indivíduos saudáveis nos parâmetros hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e plaquetas.

Tabela 4- Concentração de reticulócitos, MetHb, ácido úrico, LDH e bilirrubinas (BT, BD, BI) em pacientes com AF e grupo controle.

	AF (n= 45)	Controle (n=80)	Valor de p
Reticulócitos (%)	6,637 ± 3,511	0,8224 ± 0,5740	< 0,0001*
Metemoglobina (%)	4,009 ± 1,272	2,682 ± 0,6041	< 0,0001*
Ácido Úrico (mg/dL)	4,036 ± 1,712	3,832 ± 1,026	0,555
LDH (U/L)	670,5 ± 309,7	312,6 ± 87,47	< 0,0001*
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,5413 ± 0,324	0,1439 ± 0,057	< 0,0001*
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,290 ± 1,123	0,3216 ± 0,1560	< 0,0001* ^a
Bilirrubina total (mg/dL)	1,760 ± 1,251	0,4655 ± 0,2062	< 0,0001*

Nota: Valor de p obtido através do Teste t não pareado e Teste de Mann Whitney (a). LDH- Lactato desidrogenase. Resultado apresentado na forma de média ± desvio padrão. *Significante ao nível de 0,05. Fonte: Da própria autora.

Os pacientes com AF apresentaram aumento significativo ($p < 0,0001$) de reticulócitos, metemoglobina, LDH e bilirrubinas (BT, BD, BI) em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença significativa na dosagem de ácido úrico entre pacientes e indivíduos saudáveis (Tabela 4).

Em relação aos polimorfismos do gene *BCL11A*, observou-se uma frequência maior do alelo G selvagem de 56,7% para a região rs7557939, 59,3% do alelo mutante G para a região rs4671393 e 57,7% do alelo selvagem C para a região rs1186868 (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência alélica de acordo com as regiões do gene *BCL11A* estudadas

	rs7557939	rs4671393	rs1186868
Alelos	A - 42/90 – 46,6%	A- 36/90 – 40,0%	C- 43/80* - 53,7%
	G - 48/90 – 53,4%	G- 54/90 – 60,0%	T- 37/80* - 46,3%

Nota: * Cinco pacientes apresentaram resultado indeterminado na região (rs 1186868).

Fonte: Da própria autora.

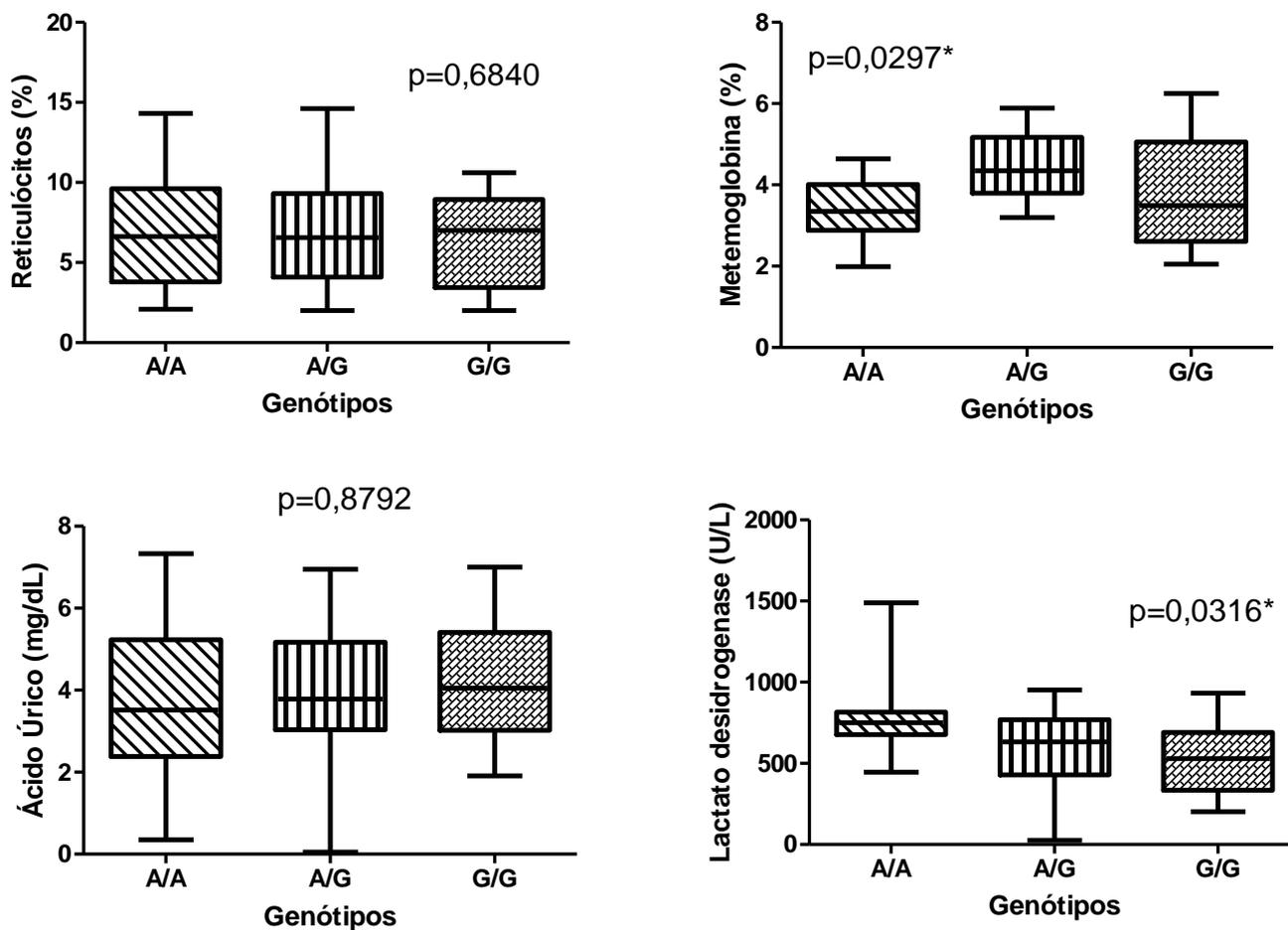
De acordo com os genótipos do gene *BCL11A*, observou-se uma frequência maior de genótipos do tipo heterozigoto em relação aos homozigotos nas regiões rs7557939 e rs118686868. Na região rs7557939 o genótipo de maior frequência foi o A/G com 44,4%, na região rs4671393 o genótipo A/G e G/G foram os mais frequentes, com 40% e na região rs1186868 a maior frequência foi do genótipo do tipo C/T com 47,5% (Tabela 6).

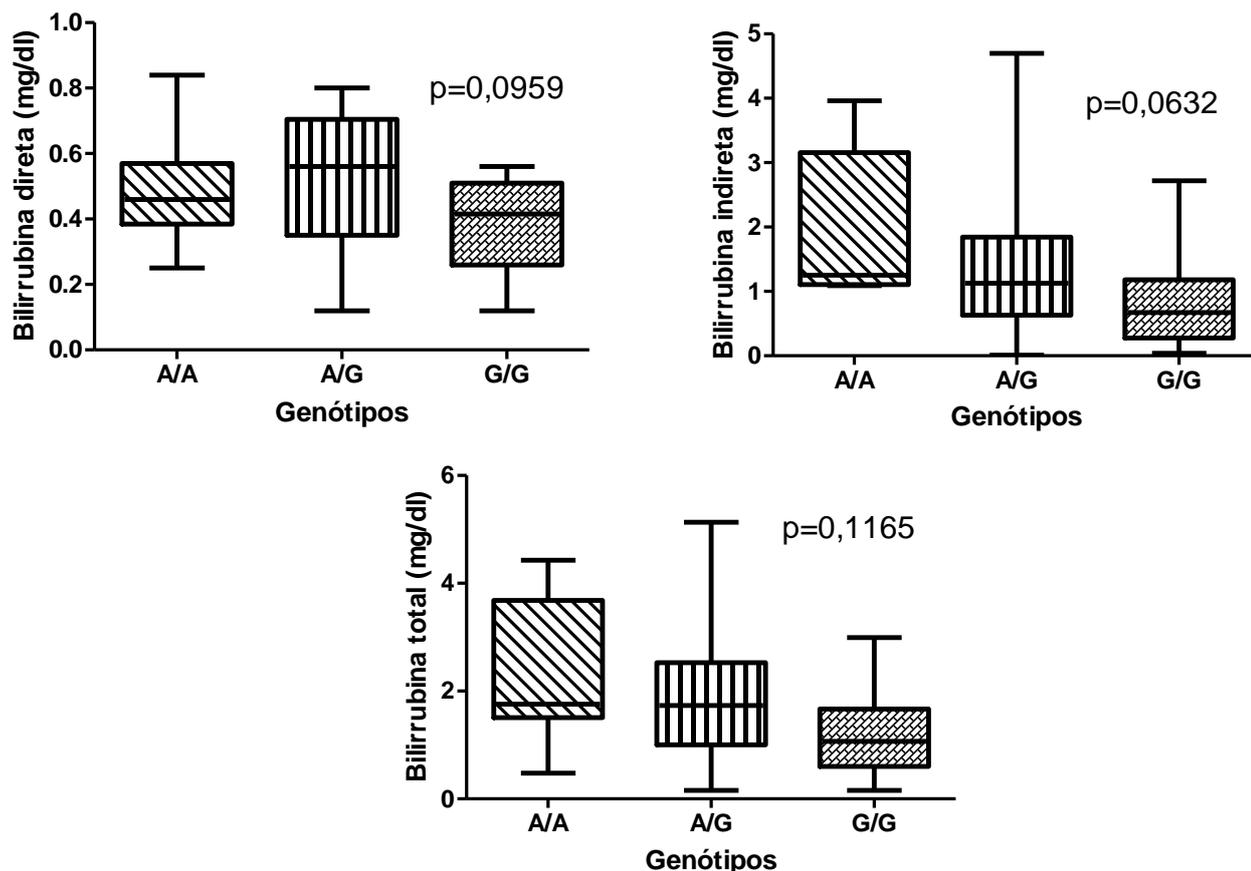
Tabela 6 – Frequência dos genótipos do gene *BCL11A* de acordo com as regiões estudadas

Genótipos	Regiões do <i>BCL11A</i> (n)	Porcentagem (%)
rs7557939		
A/A	11/45	24,4%
A/G	20/45	44,4%
G/G	14/45	31,2%
rs4671393		
A/A	9/45	20,0%
A/G	18/45	40,0%
G/G	18/45	40,0%
rs11886868		
T/T	9/40	22,5%
C/T	19/40	47,5%
C/C	12/40	30,0%

Fonte: Da própria autora

Figura 3- Concentração de reticulócitos, MethHb, LDH, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI) entre os genótipos da região rs7557939 do gene *BCL11A*.

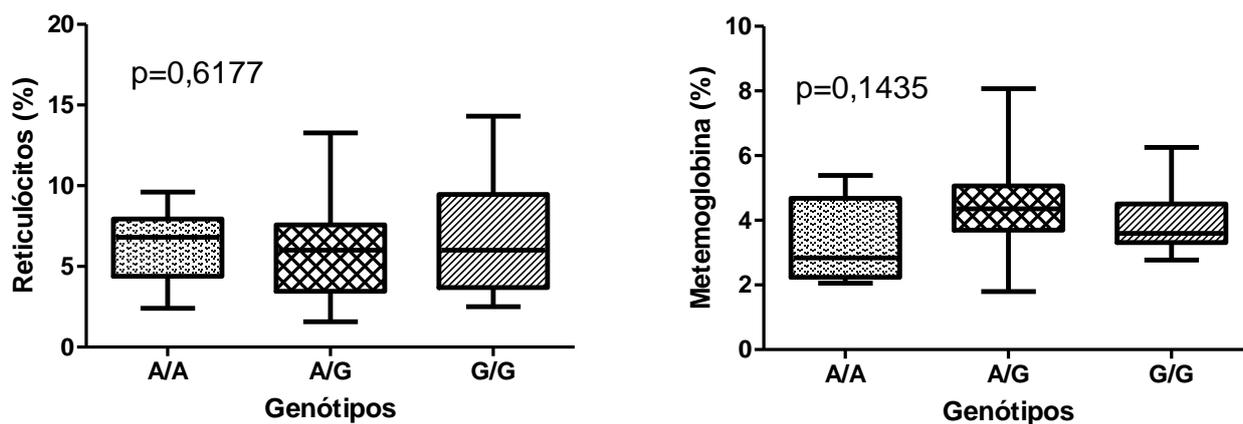


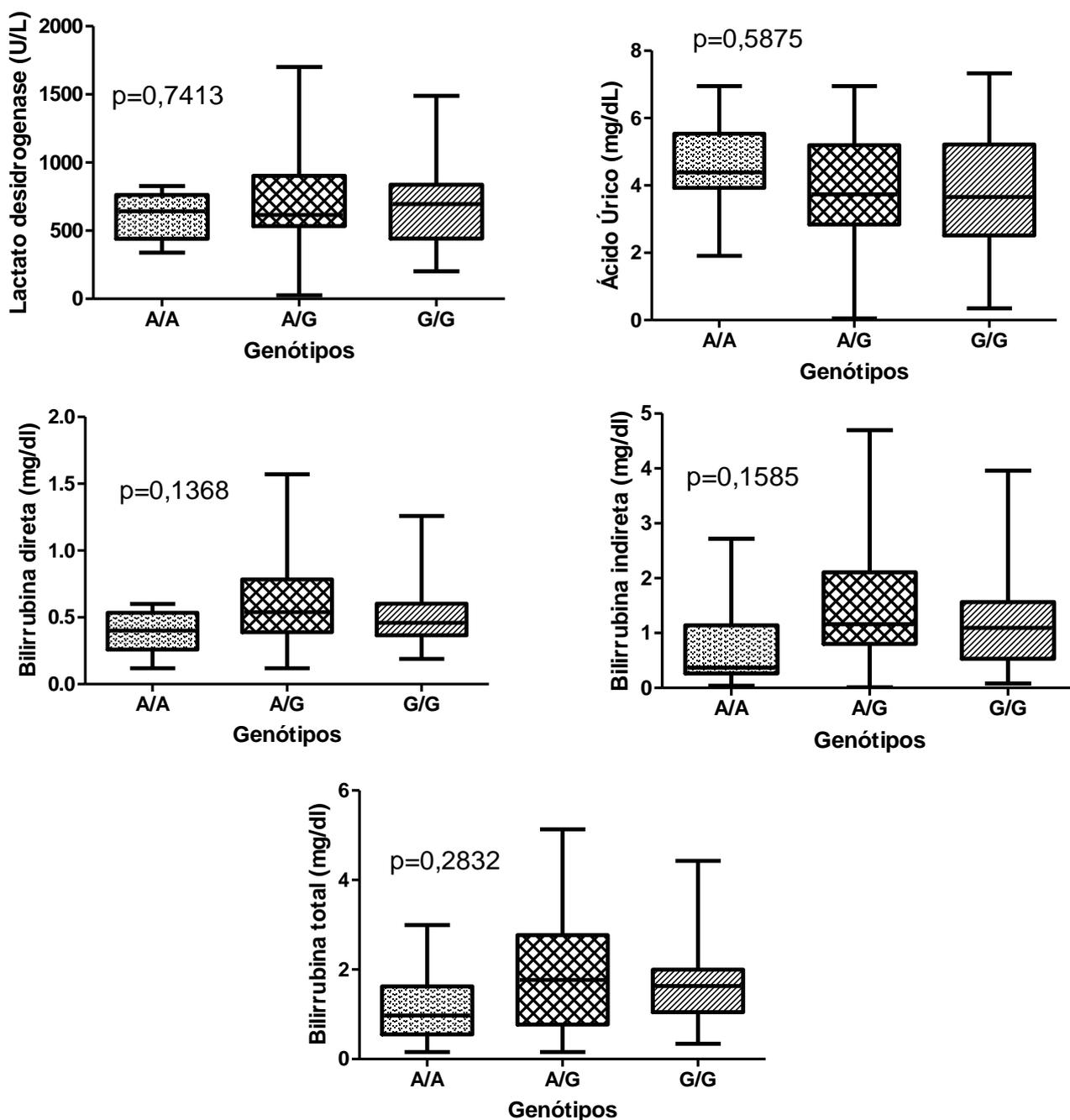


Nota: Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey. AA: n= 11; A/G: n= 20; GG: n=13. MetHb: Diferença significativa entre os grupos A/A e A/G e LDH entre os grupos A/A e G/G. *Significante ao nível de 0,05. Fonte: Da própria autora.

Na região rs7557939 do gene *BCL11A* foram estudados os três genótipos: A/A, A/G e G/G. Quando estes foram associados aos parâmetros hemolíticos observamos um aumento da produção de MetHb no genótipo A/G em relação ao A/A ($p=0,0297$) e um aumento da concentração de LDH no genótipo A/A em relação ao G/G ($p=0,0316$). (Figura 3). Os biomarcadores reticulócitos, ácido úrico e bilirrubinas não apresentaram diferença significativa entre os genótipos dessa região estudados.

Figura 4 – Concentração de reticulócitos, MetHb, LDH, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI) entre os genótipos da região rs4671393 do gene *BCL11A*.

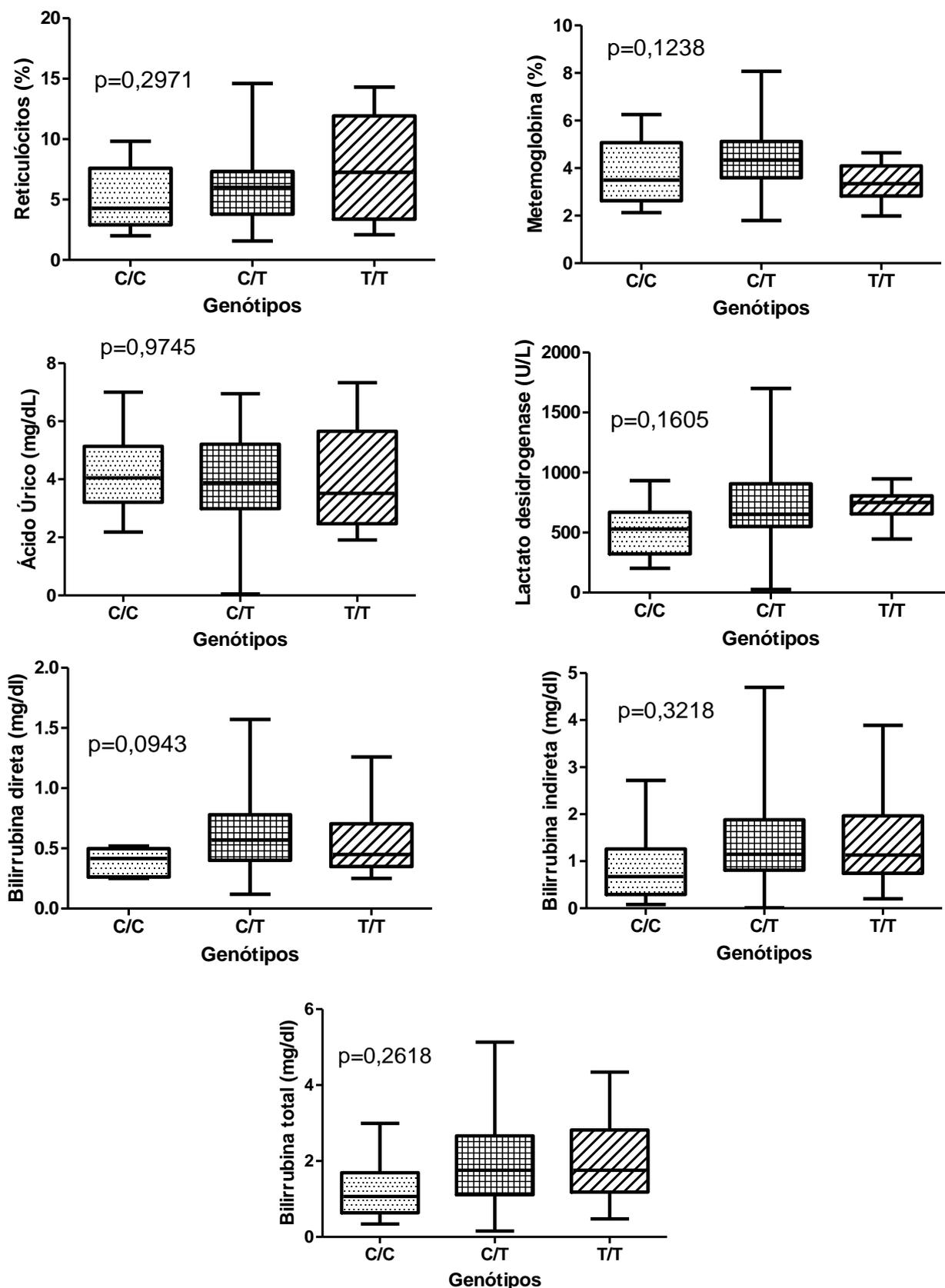




Nota: Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey. AA: n= 9; A/G: n= 18; GG: n=18. Fonte: Da própria autora.

Para as regiões rs4671393 e rs 1886868 foram analisados os genótipos A/A, A/G e G/G e C/C, C/T e T/T, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre esses genótipos e os biomarcadores de hemólise estudados (Figuras 4 e 5).

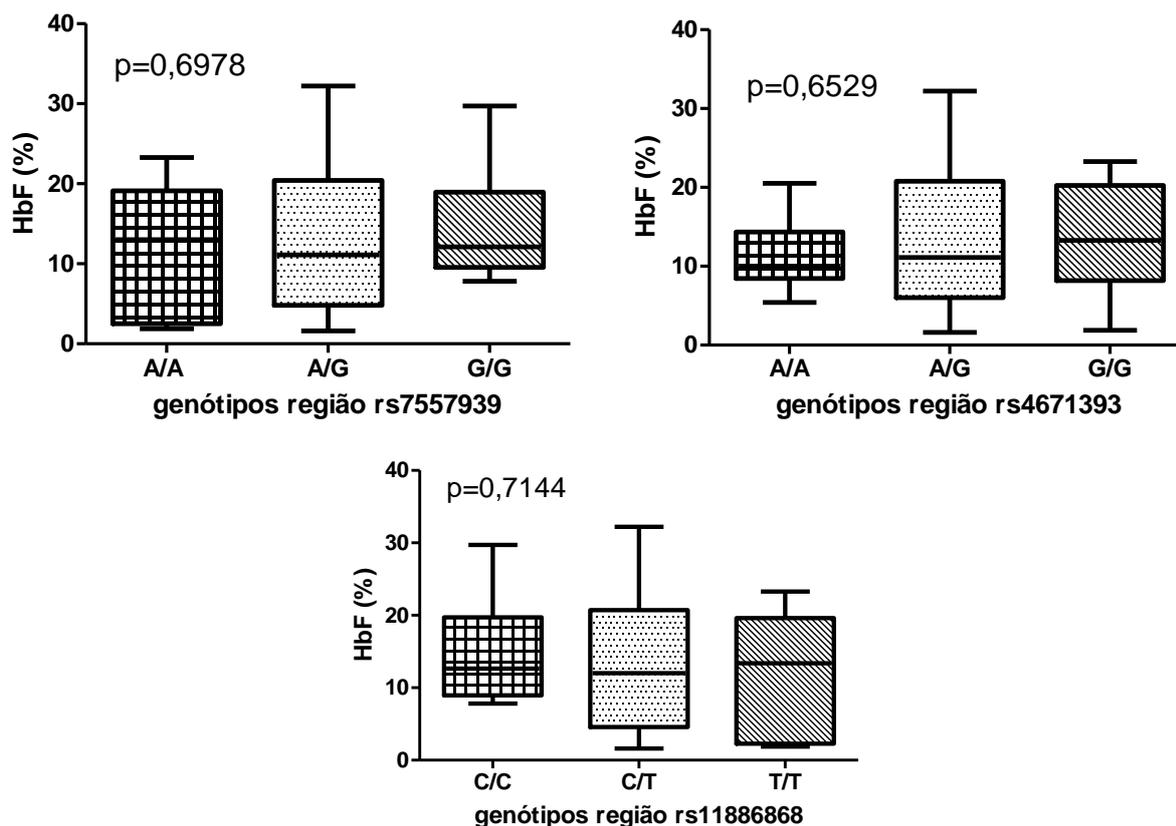
Figura 5 – Concentração de reticulócitos, MetHb, LDH, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI) entre os genótipos da região rs11886868 do gene *BCL11A*.



Nota: Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey. C/C: n= 12; C/T: n= 19; TT: n=8. Fonte: Da própria autora.

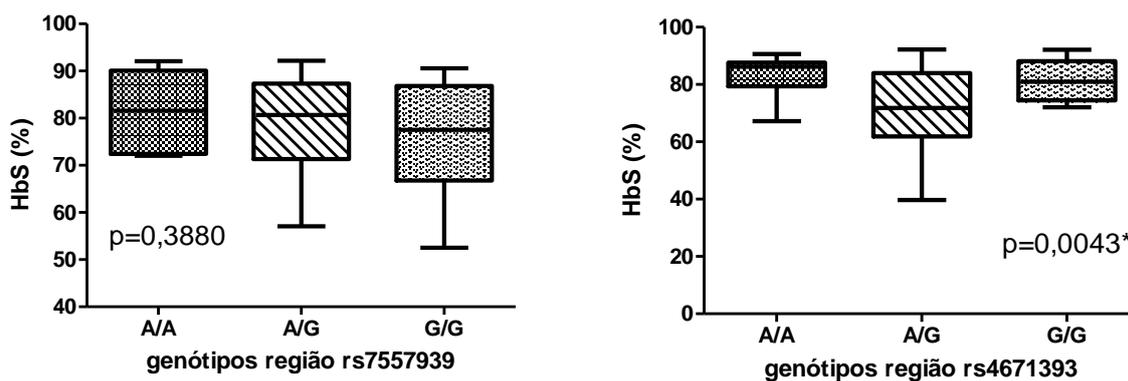
Quando comparados em relação à concentração de HbF, não foi observada diferença significativa entre os genótipos (Figura 6). Entretanto, o genótipo A/G da região rs4671393 apresentou diminuição significativa de HbS quando comparado com os genótipos A/A (selvagem) e G/G (mutante) (Figura 7).

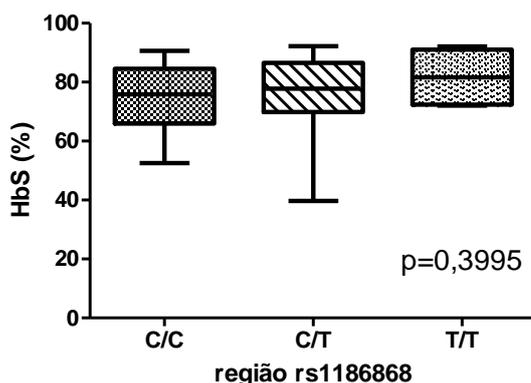
Figura 6 - Concentração de HbF entre os genótipos das regiões rs7557939, rs4671393 e rs1186868 do gene *BCL11A*.



Nota: Valores de p obtidos através do One way análise de variância com pós teste de Tukey. Fonte: Da própria autora.

Figura 7 - Concentração de HbS entre os genótipos das regiões rs7557939, rs4671393 e rs1186868 do gene *BCL11A*.



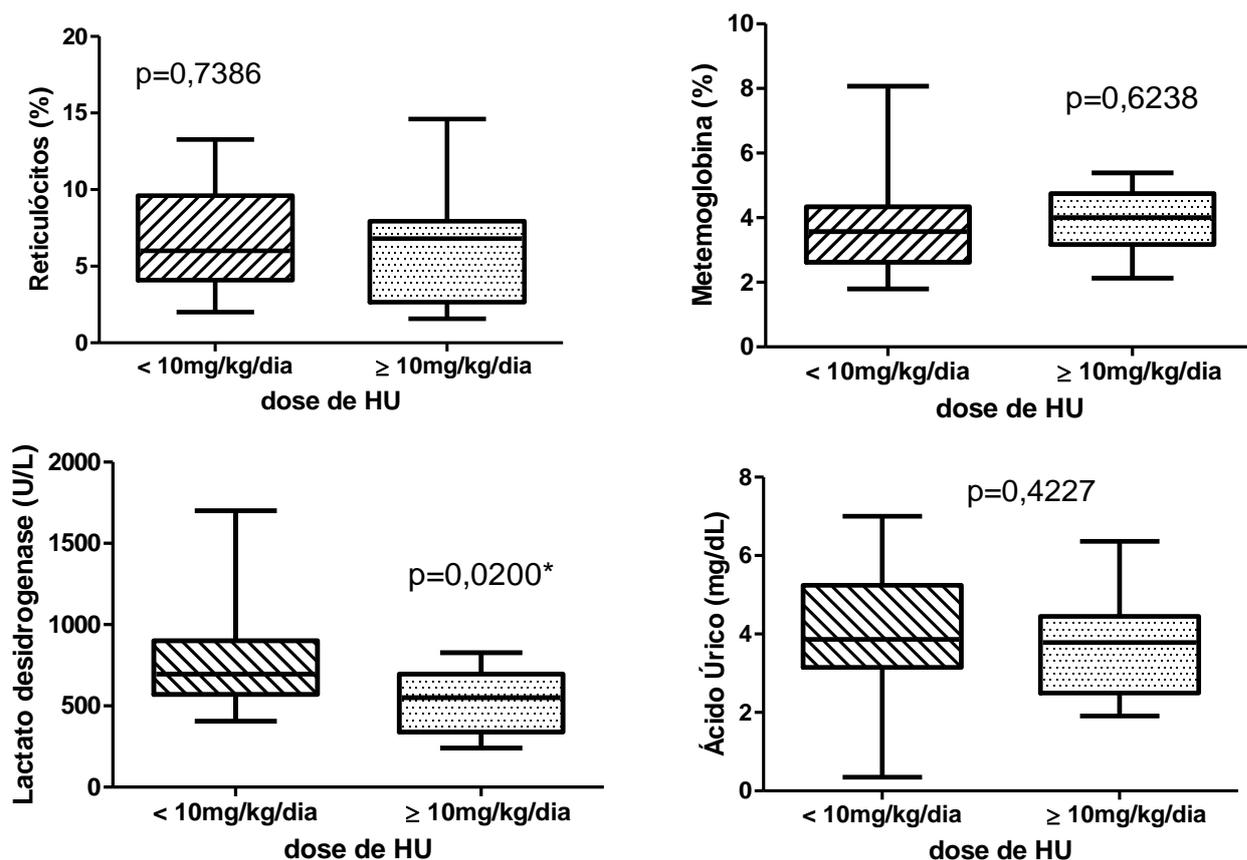


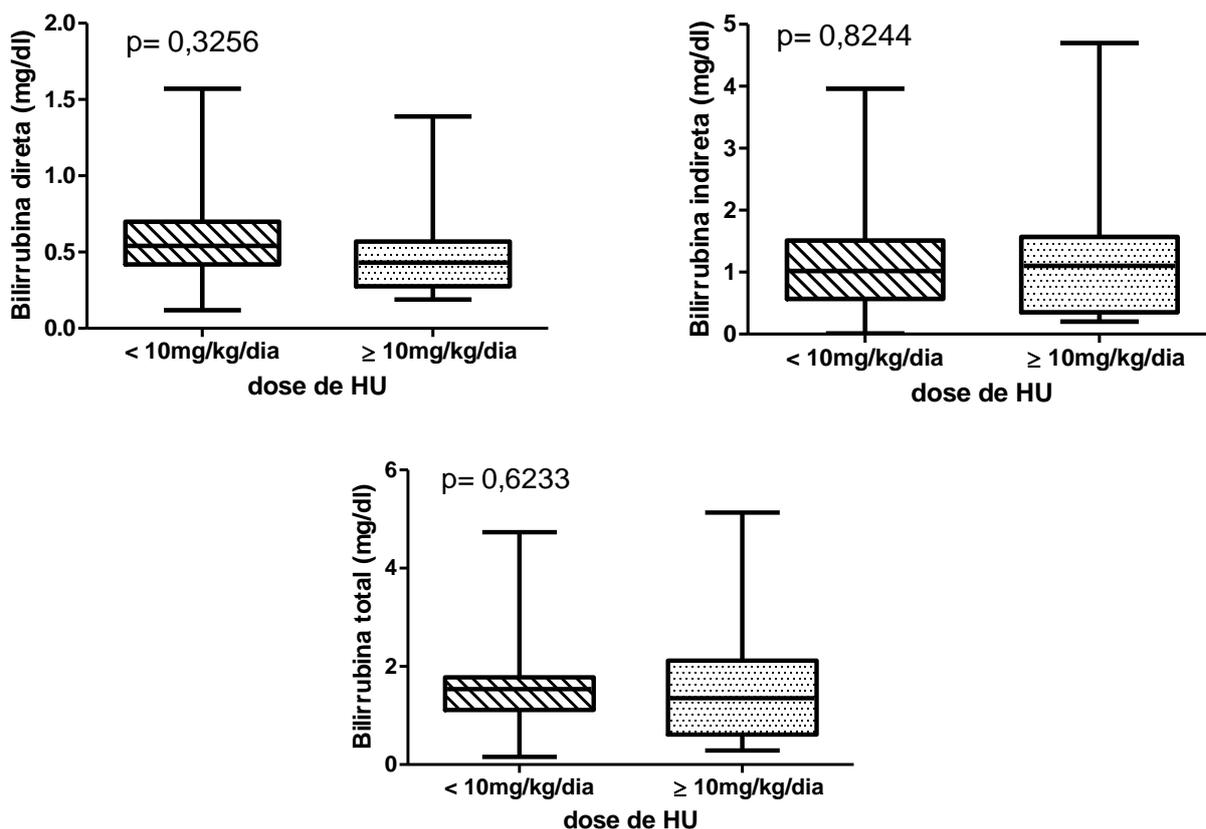
Nota: Valores de p obtidos através do One way análise de variância. *Significante ao nível de 5%. Para a região rs4671393 diferença significativa entre os genótipos G/G e A/G e A/G e A/A. Fonte: Da própria autora.

Em relação ao uso de HU, a dose média utilizada foi de 765 mg/dia (11,1 mg/kg/dia, admitindo um peso médio de 70kg por pessoa). Em relação à dose, os pacientes foram estratificados em dois grupos: pacientes em uso de HU em dose menor que 10mg/kg/dia e pacientes em uso de HU em dose maior ou igual a 10mg/kg/dia.

Quando comparou-se as dosagens dos parâmetros de hemólise com a dosagem de HU utilizada, foi evidenciado um aumento estatístico na concentração de LDH em pacientes que tomavam HU em doses inferiores a 10mg/kg/dia (Figura 8).

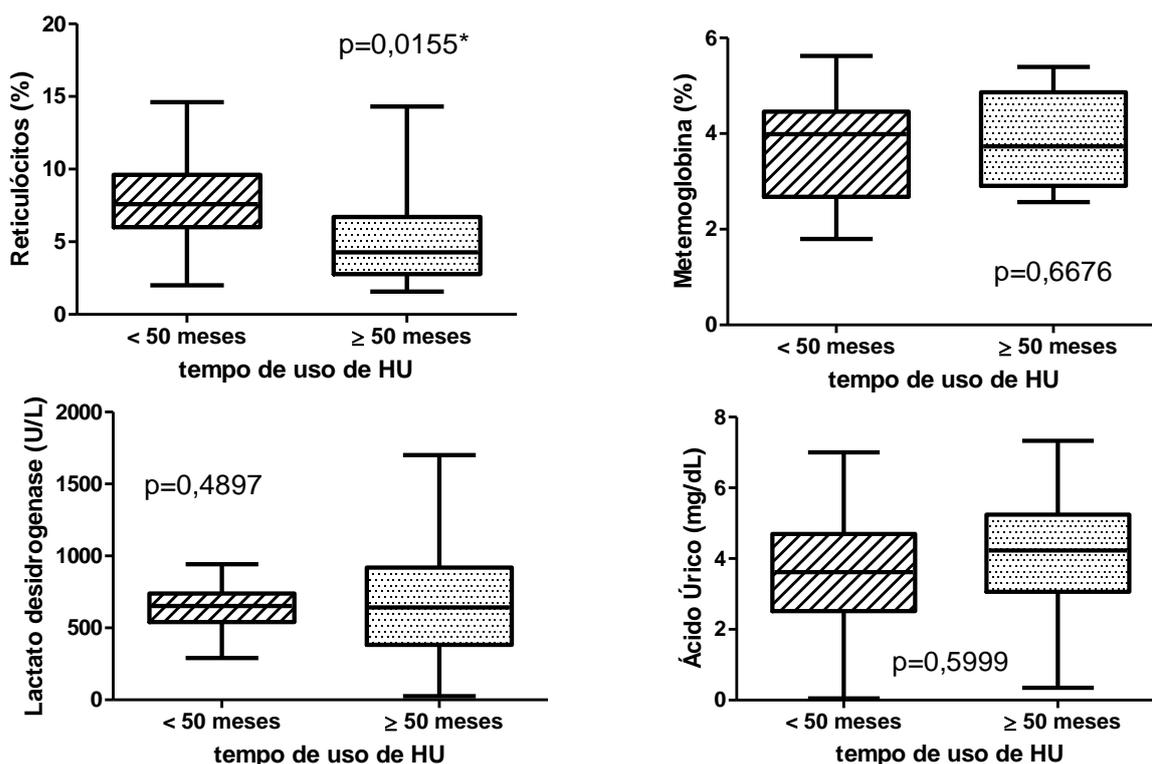
Figura 8- Concentração de reticulócitos, MetHb, ácido úrico e bilirrubinas (BT, BD, BI), LDH entre diferentes dose de HU.

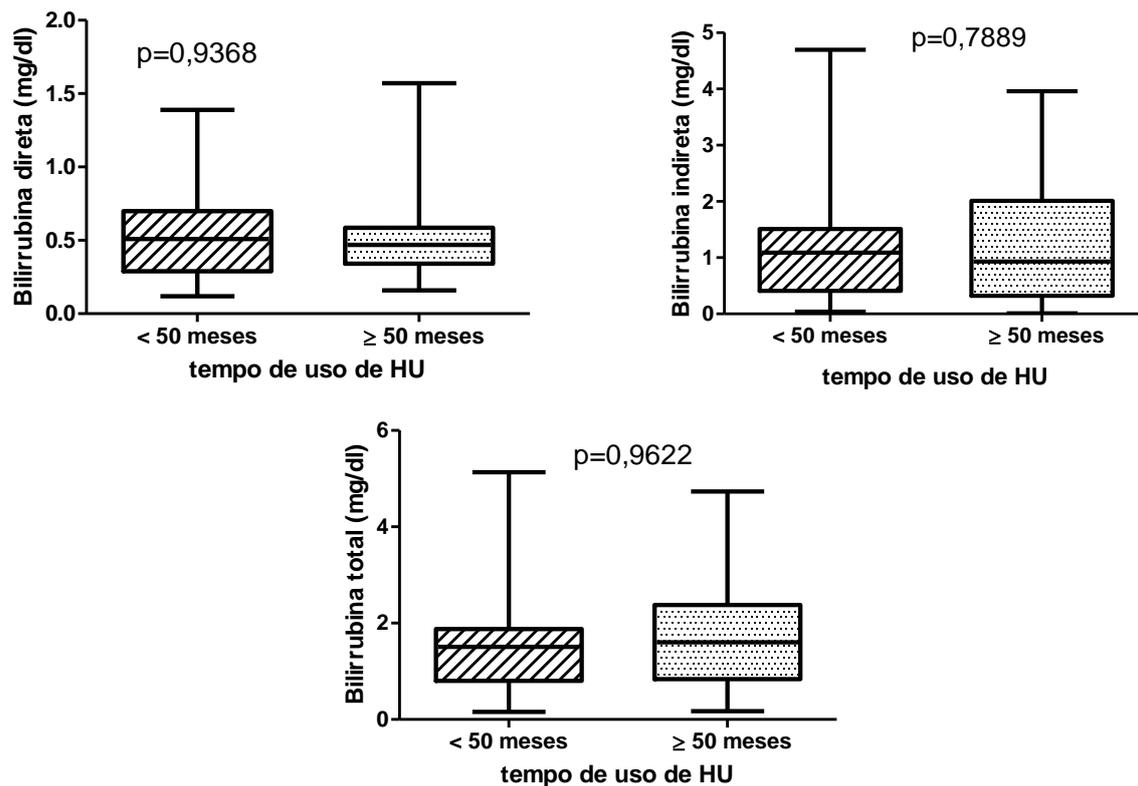




Nota: Comparação de médias dos parâmetros de hemólise entre pacientes com AF em uso de HU em diferentes doses $< 10\text{mg/kg/dia}$: $n = 24$; $\geq 10\text{mg/kg/dia}$: $n = 21$. Valor de p obtido através do teste T não pareado e teste de Mann Whitney. Dose de HU calculada admitindo-se um peso médio de 70 kg por pessoa. * $p < 0,05$. Fonte: Da própria autora.

Figura 9- Concentração de reticulócitos, MetHb, ácido úrico e bilirubinas (BT, BD, BI), LDH em relação ao tempo de uso de HU.

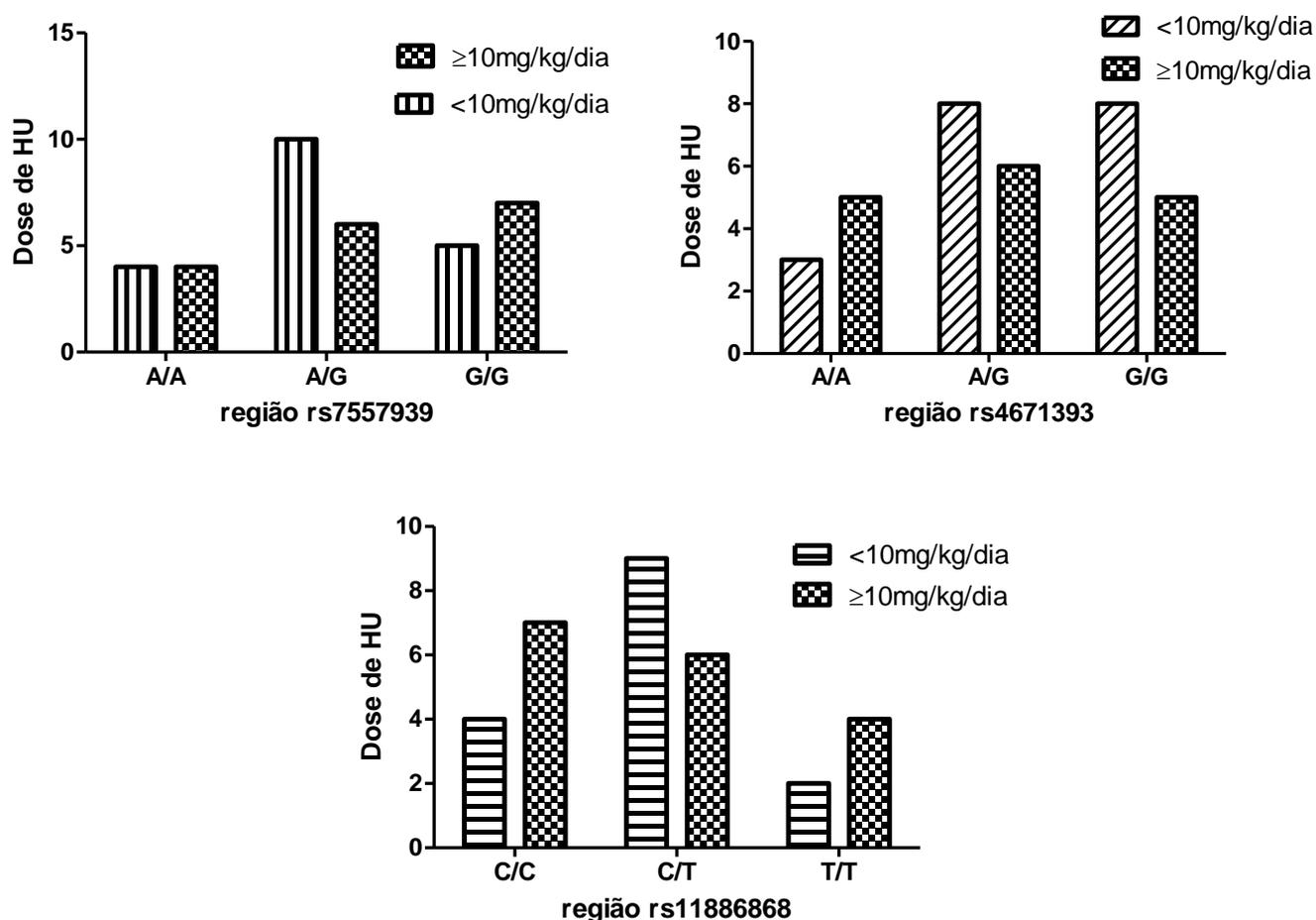




Nota: Comparação de médias dos parâmetros de hemólise em relação ao tempo de uso de HU. $n < 50$ meses = 23, $n \geq 50$ meses = 21. Valor de p obtido através do teste T não pareado e teste de Mann-Whitney. *Significante ao nível de 0,05. Fonte: Da própria autora.

A média do tempo de uso da HU pelos pacientes do estudo foi de 51,7 meses. Os pacientes foram estratificados em dois grupos: uso de HU por um período menor que 50 meses e maior ou igual a 50 meses. Observou-se uma diminuição estatística na contagem de reticulócitos ($p= 0,0155$) em pacientes que faziam uso de HU por um período maior que 50 meses. Em relação aos outros parâmetros de hemólise, não foi observada diferença estatística quanto ao tempo de uso de HU (Figura 9).

Figura 10- Associação das regiões do *BCL11A* com a dose de HU utilizada



Nota: Gráfico de associação entre os genótipos do *BCL11A* e a dose de HU utilizada pelos pacientes com AF. Região rs7557939 dose $< 10\text{mg/kg/dia}$: (n) A/A = 5; A/G = 12; G/G = 7; dose $\ge 10\text{mg/kg/dia}$: (n) A/A = 5; A/G = 7; G/G = 8. Região rs4671393 dose $< 10\text{mg/kg/dia}$: (n) A/A = 5; A/G = 10; G/G = 9; dose $\ge 10\text{mg/kg/dia}$: (n) A/A = 6; A/G = 9; G/G = 6; Região rs11886868 dose $< 10\text{mg/kg/dia}$: (n) C/C = 6; C/T = 13; T/T = 5; dose $\ge 10\text{mg/kg/dia}$: (n) C/C = 8; C/T = 7; T/T = 6. Valor de p obtido através do teste de Qui-quadrado. Fonte: Da própria autora.

Quando associou-se a dose de HU utilizada de acordo com as regiões dos polimorfismos do gene *BCL11A*, não obtivemos diferença significativa entre os genótipos, apesar de ser observado o uso de doses menores de HU ($< 10\text{mg/kg/dia}$) em pacientes que apresentavam o genótipo heterozigoto para as três regiões estudadas (Figura 10).

5 DISCUSSÃO

A AF é uma hemoglobinopatia caracterizada por anemia hemolítica do tipo normocítica e normocrômica. A anemia é de grau variável dependendo do estado da doença (basal e estacionário ou em crise hemolítica). Além da anemia o paciente pode apresentar leucocitose (NOGUEIRA; SILVA; PAIVA, 2013). O uso de HU por esses pacientes promove modificações no perfil do hemograma como a redução do quadro anêmico, da leucocitose e do VCM, fato atribuído à ação citorredutora da droga, além do aumento da HbF (WONG *et al*, 2014). Ao comparar os resultados do presente estudo com um grupo controle constituído por indivíduos sem hemoglobinopatias, verificamos alterações significativas em relação aos parâmetros do hemograma hemoglobina, hematócrito, VCM e contagem de plaquetas. Esse fato pode ser devido ao perfil hematológico dos pacientes com AF, que mesmo em uso de HU, apresentam alterações importantes nos referidos parâmetros. Portanto, nossos resultados corroboram com os outros estudos semelhantes (LAURENTINO *et al*, 2014; CAVALCANTE *et al*, 2015; MIKOBİ *et al*, 2015; MOREIRA *et al*, 2015).

A hemólise característica da doença faz parte de uma cadeia de eventos que culminam na vaso-occlusão, podendo levar ao quadro de isquemia. Portanto, quanto maior o quadro hemolítico, maior o risco de complicações tais como hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo e possivelmente doenças cerebrovasculares (KATO *et al*, 2007) A hemólise como já acima mencionado ocorre de forma crônica, promovendo redução da meia-vida da hemácias, que libera substâncias do seu interior de forma progressiva causando várias complicações, dentre elas a redução da disponibilidade do NO (REES; GIBSON, 2011; MILTON *et al*, 2013; DAMANHOURI *et al*, 2014).

Biomarcadores podem ser definidos como indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos em uma condição específica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Inicialmente o estudo objetivou avaliar as diferenças dos biomarcadores de hemólise na AF em relação a indivíduos sem hemoglobinopatias. Verificamos um aumento significativo na contagem de reticulócitos e nas dosagens séricas de MetHb, LDH e bilirrubinas total, direta e indireta, nos pacientes com AF em relação ao outro grupo. O aumento desses parâmetros deveu-se ao fato da AF ser uma anemia hemolítica. Resultados semelhantes foram encontrados por outros estudos na literatura (REES; GIBSON, 2011; MOREIRA *et al*, 2014; MIKOBİ *et al*, 2015).

A metemoglobinemia ocorre quando há frequente oxidação da hemoglobina. Na AF isso ocorre de forma constante devido à facilidade da HbS de sofrer oxidação e hemólise. O aumento de MetHb em indivíduos com a presença de HbS também foi constatado por Naoum e Souza (2004), Silva Filho (2005), Allen e colaboradores (2012) e Laurentino e colaboradores (2014). A elevação da LDH está relacionada às situações em que ocorre grande destruição celular, como nos casos das anemias hemolíticas, insuficiência cardíaca congestiva, doenças musculares, lesões hepáticas, neoplasias, entre outros. Nas DF associadas às crises de hemólise, a LDH apresenta-se com concentrações elevadas, fato que a caracteriza como sensível marcador biológico da destruição de eritrócitos (REES; GIBSON, 2011; BALLAS, 2013; DAMANHOURI *et al*, 2014; MIKOBİ *et al*, 2015). O aumento da concentração de ácido úrico na AF decorre da reutilização de ácidos nucleicos provenientes da degradação da globina devido à hemólise. Foi obtido um aumento na concentração do ácido úrico, porém não significativo, resultado semelhante aos obtido por Arlet e colaboradores (2012) e Moreira e colaboradores (2015).

A Bilirrubinemia em pacientes com AF também foi evidenciada no estudo de Milton e colaboradores (2013). A bilirrubina é o principal produto do metabolismo do grupo heme. Cerca de 70% são provenientes da destruição de eritrócitos senescentes. Na AF ocorre a destruição precoce dos eritrócitos, elevando a concentração de bilirrubina total, principalmente devido ao aumento de bilirrubina indireta.

O quadro clínico na AF pode variar de sintomatologia leve a quadro clínico grave, fato atribuído a causas multifatoriais, como ambientais e genéticas. Moduladores da doença estão bem definidos na literatura, sendo muito utilizados na clínica médica a concentração da HbF. Fatores genéticos tais como a presença de co-interação com a talassemia e os haplótipos da β -globina são moduladores da doença, juntamente com a presença de polimorfismos dos genes *BCL11A*, *HBS1L-MYB*, *Xmn1-HBG2*. Estes polimorfismos genéticos podem aumentar as taxas da HbF a valores entre 20 a 50% e consequentemente reduzem a HbS e todos os eventos associados à presença desta (UDA *et al*, 2008; BAGHAT; PATRA; THAKUR, 2012; CARDOSO *et al*, 2014). O *BCL11A* está fortemente associado à modulação de HbF, podendo ocasionar variações de até 18% na concentração de HbF em pacientes com AF, portanto, pesquisas que estudem moduladores genéticos são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos que

possibilitem o aumento da HbF, entretanto, sem o risco de genotoxicidade do uso da HU à longo prazo (AKINSHEYE *et al*, 2011).

Em relação aos polimorfismos do gene *BCL11A*, no presente estudo foram analisadas três regiões: rs7557939, rs4671393 e rs11886868, selecionadas a partir de estudo na população brasileira (LETTRE *et al*, 2008). A frequência dos mesmos se apresentou da seguinte forma de acordo com a região: genótipo A/G (44,4%) para a região rs7557939; A/G (40%) e G/G (40%) para a região rs4671393 e C/T (47,5%) para a região rs11886868.

A análise da associação dos polimorfismos rs7557939, rs4671393 e rs11886868 do gene *BCL11A* com os biomarcadores de hemólise mostrou uma associação da MetHb e da LDH com genótipos da região rs7557939. A concentração de MetHb apresentou um aumento significativo no genótipo A/G (heterozigoto) quando comparados ao A/A (mutante). A LDH apresentou aumento significativo no genótipo A/A (mutante) em relação ao do genótipo G/G (selvagem). Portanto, os biomarcadores MetHb e LDH estão associados à região rs7557939 em pacientes adultos em estado basal na AF. Achado que pode sugerir o envolvimento do polimorfismo do gene *BCL11A* nessa região como modulador na concentração da HbF, conseqüentemente agravando o quadro de hemólise nesses pacientes. Esses resultados diferem do observado por Sheehan e colaboradores (2013), que demonstraram um aumento da concentração de HbF, em crianças com AF, sem uso de HU com genótipo mutante (A/A) para a região rs7557939 do *BCL11A*. Fato que pode ser atribuído à diferentes fatores, tais como amostragem, uso do medicamento, idade dos pacientes, entre outros.

A pequena amostragem da casuística dificultou a estratificação pelo tipo de genótipo, podendo este estudo não representar em totalidade a população do Estado do Ceará. O estudo de Lettre e colaboradores (2008) demonstrou que polimorfismos na região rs7557939 e rs4671393 estão mais fortemente associados ao aumento de HbF do que os presentes na região rs11886868. Entretanto, outros estudos observaram uma forte associação das regiões rs11886868 e rs4671393 com a concentração de HbF (UDA *et al*, 2008; FERREIRA, 2011; CARDOSO *et al*, 2014; CHAOUCH *et al*, 2015). A associação dos genótipos do gene *BCL11A* com o aumento da HbF não foi evidenciada no presente estudo, o que pode ser atribuído ao restrito número amostral analisado e também ao uso da HU pelos pacientes.

Em relação à associação da concentração de HbS com os genótipos do *BCL11A*, observou-se um aumento da concentração de HbS no genótipo A/A (selvagem) da região rs4671393. Não foram encontrados estudos na literatura avaliando essa relação.

A HU é o medicamento utilizado para o tratamento da AF por aumentar a concentração da HbF, conseqüentemente melhorando o quadro clínico dos pacientes (WONG *et al*, 2014). Observou-se no presente estudo que pacientes em uso de HU na dose maior que 10mg/kg/dia apresentaram diminuição da enzima LDH. A redução da contagem de reticulócitos foi evidenciada em pacientes em uso de HU por um período maior que 50 meses. Estes resultados podem estar relacionados com os benefícios que o uso da HU proporcionou aos pacientes, aumentando a concentração de HbF e diminuindo conseqüentemente a hemólise. Aparentemente a melhora do efeito está associada ao tempo de uso e à dose utilizada, entretanto, é importante ressaltar que muitos fatores ainda não estão esclarecidos sobre a ação da HU nos pacientes com AF, tais como dose terapêutica ideal, mecanismo de ação da droga, a intensa variabilidade da resposta terapêutica (relacionada à metabolização do fármaco e à presença de polimorfismos genéticos), e a provável citotoxicidade e genotoxicidade da droga (LETTRE *et al*, 2008).

Com o propósito de verificar se polimorfismos no gene *BCL11A* poderiam influenciar na dose HU utilizada pelos pacientes do presente estudo, foi realizada uma análise da possível associação entre as doses de HU <10mg/kg/dia e \geq 10mg/kg/dia com os genótipos do *BCL11A*. Não foi evidenciada significância estatística entre os grupos, provavelmente devido ao baixo número de pacientes incluídos no estudo. No entanto, observou-se que pacientes com o genótipo A/G para a região rs7557939 faziam uso em sua grande maioria doses de HU <10mg/kg/dia, o que pode ter influenciado no aumento da produção de MetHb.

Neste contexto podemos inferir que o estudo apresenta algumas limitações, o que pode ter influenciado nos resultados. Um deles foi o baixo número de participantes incluídos, que deveu-se em grande parte à dificuldade de encontrar pacientes em estado basal da doença e que se encaixassem em todos os parâmetros estabelecidos por Ballas (2012). Além disso, vários fatores podem influenciar na variação da concentração de HbF, tais como os haplótipos do gene da β -globina S, polimorfismos em regiões promotoras da γ -globina e o uso da HU. Logo, estudos de farmacogenética são necessários para analisar a influência de diversos SNPs na concentração de HbF e na resposta ao tratamento com

HU, tais como *BCL11A*, *Xmnl*, *ARG1*, *ARG2* e para o desenvolvimento de possíveis terapias alvo para o tratamento da AF (IOLASCON; ANDOLFO; RUSSO, 2015).

Os achados do trabalho mostram que os polimorfismos do gene *BCL11A* não apresentaram influência no tratamento com HU. Além disso, o genótipo A/A e A/G da região rs7557939 apresentaram uma associação, respectivamente, com as concentrações de LDH e de MetHb, mostrando a influência de polimorfismos no gene *BCL11A* sobre os parâmetros hemolíticos, podendo estes serem utilizados como biomarcadores de prognóstico.

6 CONCLUSÃO

- Pacientes com AF e indivíduos saudáveis apresentaram uma diferença entre os parâmetros hematológicos hemoglobina, hematócrito, VCM e plaquetas.
- Pacientes com AF apresentaram um aumento dos parâmetros de hemólise reticulócitos, metemoglobina, LDH e bilirrubinas (BT, BD, BI) em relação ao grupo controle.
- Constatou-se uma maior frequência do genótipo A/G para a região rs7557939; A/G e G/G para a região rs4671393 e C/T para a região rs11886868 do gene *BCL11A*.
- Os genótipos A/A e A/G da região rs7557939 do *BCL11A* apresentaram, respectivamente, aumento da concentração de LDH e MetHb.
- Pacientes com AF que estavam utilizando HU há menos de 50 meses apresentaram um aumento na contagem de reticulócitos e os que utilizavam em uma dose <10mg/kg/dia apresentaram aumento de LDH.
- Observou-se aumento da concentração de HbS no genótipo A/A da região rs4671393.
- Não foi evidenciado significância estatística na associação entre as doses de HU <10mg/kg/dia e ≥ 10 mg/kg/dia com os genótipos do *BCL11A*.

REFERÊNCIAS

- AKINSHEYE, I.; ALSULTAN, A.; SOLOVIEFFN N.; NGO, D.; BALDWIN, C.T.; SEBASTIANI,P.; CHUI, D.H.K.; STEINBERG, M.H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v.118, n.1, 2011.
- ARLET, J.B.; RIBEIL, J.A.;CHATELLIER, G.;POUCHOT, J.;MONTALEMBERT, M.; PRIÉ, D.;COURBEBAILLISSE, M. Hyperuricémie chez les patients drépanocytaires suivis en France. **La Revue de Médecine Interne.**, v. 33, n. 1, p.13 - 17, 2012.
- BAGHAT, S.; PATRA, P.K.; THAKUR, A.S. Association between XmnI Polymorphism and HbF Level in Sickle Cell Disease Patients from Chhattisgarh. **Int J Biomed Sci.** v. 8, n.1, p. 36-39, 2012.
- BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: Steady statevbase line data. **Am J Hematol.**, United States, n. 87, v. 3, p. 338, 2012.
- BALLAS, S.K. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n.1, 2013.
- BELINI JUNIOR, E.; SILVA, D.G.H.; TORRES, L.S.T.; OKUMURA, J.V.; LOBO, C.L.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules and Diseases.** v. 54, p.321–327, 2015.
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP, 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin. Pharmacol. Ther.** 69, 89 - 95.
- BHANUSHALI, A.A.; PATRA, P.K.; NAIR, D.; VERMA, H.; DAS, B.R. Genetic variant in the BCL11A (rs1427407), but not HBS1-MYB (rs6934903) loci associate with fetal hemoglobin levels in Indian sickle cell disease patients. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 54, p. 4–8, 2015.
- BITOUNGUI, V.J.N.; 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, Molecules and Diseases** v. 54, p 268–269, 2015.
- CAMARGO, T.M.; ALVES, M.I.F.; OLIVEIRA, S.J.; SHITARA, E.S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 39 (2), p. 95-98, 2007.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.29 no.3, 2007
- CANÇADO, R. D.; LOBO C.; ÂNGULO, I.L.; ARAÚJO, P.I.C.; JESUS, J.A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxíureia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.

CARDOSO, G.L.; DINIZ, I.G.; SILVA, A.N.L.M.; CUNHA, D.A.; JUNIOR, J.S.S.; UCHÔA, C.T.U.; SANTOS, S.E.B.; TRINDADE, S.M.S.; CARDOSO, M.S.O.; GUERREIRO, J.F.G. 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, Molecules, and Diseases**, v. 53, n.4, p.176-178, 2014.

CARVALHO, S.C.; CARVALHO, L.C.; FERNANDES, J.G.; SANTOS, M.J.S. Em busca da equidade no sistema de saúde brasileiro: o caso da doença falciforme. **Saúde Soc.** São Paulo, v.23, n.2, p.711-718, 2014.

CAVALCANTE, J.E.; MACHADO, R.P.; LAURENTINO, M.R.; SANTOS, T.E.; BANDEIRA, I.C.; FILHO P.A.; FIGUEIREDO, M.F.; MARTINS, A.M.; LEMES, R.P.G. Clinical events and their relation to the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes in Sickle-Cell Anemia patients. **Hematol Oncol Stem Cell Ther.**, 2015.

CHAOUCH, L.; MOUMNI, I.; OURAGINI, H.; DARRAGI, I.; KALAI, M.; CHAOUACHI, D.; BOUDRIGUA, I.; HAFSIA, R.; ABBES, S. rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. **Hematology.**, 2015.

CERQUEIRA, B.A. BOAS, W.V.; ZANETTE, A.A.D.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M.S. Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com anemia falciforme de Salvador- Bahia. **Gaz. méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 24-28, 2010.

CERQUEIRA, B. A.; BOAS, W. V.; ZANETTE, A. D.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine.**, v. 56, p. 471-76, 2011.

CONGER, J. D. Acute uric acid nephropathy. **Med Clin N Am.**v.74, n.4, p.859–71, 1990.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

DAMANHOURI, G.A.; JARULLAH, J.; MAROUF, S.; HINDAWI, S.I.; MUSHTAQ, G.; KAMAL, M.A. Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 24–31, 2015.

DIAMOND, H. S.; MEISEL, A. D.; HOLDEN, D. The natural history of urate overproduction in sickle cell anemia. **Ann Intern Med.**, v.90, n.5, p.752–7, 1979.

ELDERDERY, A.Y.; MILLS, J.; MOHAMED, B.A.; COOPER, A.J.; MOHAMMED, A.O.; ELTIEB, N.; OLD, J. Molecular analysis of the b-globin gene cluster haplotypes in a Sudanese population with sickle cell anaemia. **Int. Jnl. Lab. Hem.** v. 34, p.262 – 266, 2012.

FANIS, P.; KOUSIAPPA, I.; PHYLACTIDES, M.; KLEANTHOUS, M. Genotyping of BCL11A and HBS1L-MYB SNPs associated with fetal haemoglobin levels: a SNaPshot minisequencing approach. **Genomics**, n 15, v108, 2014.

FERREIRA, E.M.C.D. **Factores Genéticos Moduladores do Fenótipo da Drepanocitose**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Portugal, 2011.

FLEURY, M.K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **RBAC**, vol. 39, n. 2, p. 89-93, 2007

GALIZA NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

HOPPE, C.C. Inflammatory Mediators of Endothelial Injury in Sickle Cell Disease. **Hematol Oncol Clin N Am** n. 28, p. 265–286, 2014.

HUANG, J.; ZOU, Z.; KIM-SHAPIRO, D.B.; BALLAS, S.K.; KING, S.B. Hydroxyurea Analogues As Kinetic and Mechanistic Probes of the Nitric Oxide Producing Reactions of Hydroxyurea and Oxyhemoglobin. **J. Med. Chem.**, United States, n. 46, v. 17, p. 3748-3753, 2004.

IANNONE, R.; OHENE-FREMPONG, K.; FUCHS, E. J.; CASELLA, J. F.; CHEN, A. R. Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Anemia: Progress and Prospects. **Pediatr Blood Cancer**, v. 44, p. 436 – 440, 2005.

IOLASCON, A.I.; ANDOLFO, I.; RUSSO, ROBERTA. Red cells in post-genomic era: impact of personalized medicine in treatment of anemias. **Haematologica**, v. 100, n. 1, 2015.

JAIN, D.L.; APTE, M.; COLAH, R.; SARATHI, V.; DESAI, S.; GOKHALE, A.; BHANDARWAR, A.; JAIN, H.L.; GHOSH, K. Efficacy of fixed low dose hydroxyurea in Indian children with sickle cell anemia: a single centre experience. **Indian Pediatr.**, n.50, v. 10, p. 929-33, 2013.

JESUS, J.A. Doença falciforme no Brasil. **Gaz. méd. Bahia**; n 80, v 3, p 8-9, 2010.

JIALAL, I.; SKOLL, L. J. Clinical Utility of Lactate Dehydrogenase. A Historical Perspective. **Am J Clin Pathol**; v. 143, p.158-159, 2015.

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** , v. 21, n.1, p. 37–47, 2007.

KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M.T. Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. **Am. J. Hematol.**, v. 84, n. 9, p. 618 – 625, 2009.

LAURENTINO, M.R.; CARVALHO, T.M.J.P.; SANTOS, T.E.J.; BARBOSA, M.A.; SANTOS, T.N.; GONÇALVES, R.P. 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.

LAURENTINO, M.R.; MAIA FILHO, P.A.; BARBOSA, M.C.; BANDEIRA, I.C.J.; ROCHA, L.B.S.; GONÇALVES, R.P. Influence of β S-globin haplotypes and hydroxyurea on tumor necrosis factor-alpha levels in sickle cell anemia. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 36, n. 2, p. 121 - 125, 2014.

LETTRE, G.; SANKARAN, V.G.; BEZERRA, M.A.; ARAÚJO, A.S.; UDA, M.; SANNA, S.; CAO, A.; SCHLESSINGER, D.; COSTA, F.F.; HIRSCHHORN, J.N.; ORKIN, S.H. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci** v. 105, n 33, p11869-74, 2008.

MA, Q.M.; LU, A.Y.H. Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Individualized Medicine. **Pharmacol Rev** v. 63, p. 437 - 459, 2011

MANFREDINI, V.; CASTRO, S.; WAGNER, S.; BENFATO, M.S. A Fisiopatologia da Anemia Falciforme. **Infarma**, Brasília, n. 1/2, v. 19, 2007.

MILTON, J.N.; ROOKS, H.; DRASAR, E.; MCCABE, E.L.; BALDWIN, C.T.; MELISTA, E.; GORDEUK, V.R.; NOURAI, M.; KATO, G.R.; MINNITI, C.; TAYLOR, J.; CAMPBELL, A.; LUCHTMAN-JONES, L.; RANA, S.; CASTRO, O.; ZHANG, Y.; THEIN, S.L.; SEBASTIANI, P.; GLADWIN, M.T.; WALK-PHAAST, INVESTIGATORS, STEINBERG, M.H. Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** v.161, n.2, p 270-8, 2013.

MIKOBI, T.M.; LUKUSA, T.P.; ALONI, M.N.; MVUMBI, L.G.; AKILIMALI, P.Z.; MUYEMBE-TAMFUM, J.J.; RACE, V.; MATTHIJS, G.; MBUYI, M.J.M. Correlation between the Lactate Dehydrogenase Levels with Laboratory Variables in the Clinical Severity of Sickle Cell Anemia in Congolese Patients. **PLoS One.** v. 6; n.10(5), 2015.

MOREIRA, J.A.; LAURENTINO, M.R.; MACHADO, R.P.G.; BARBOSA, M.C.; MOTA, A.M.; ROCHA, L.B.S; MARTINS, A.M.C.; ARRUDA, A.B.L.; SOUZA, I.P.; GONÇALVES, R.P. Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. **Rev bras hematol hemoter.**, n. 37, v. 3, p.167-171, 2015.

NAOUM, P.C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M.S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 26, n. 1, P. 19-22, 2004.

NAOUM, P.C.; SOUZA, P.C. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/ β 0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. **J Bras Patol Med Lab**, São José do Rio Preto, v. 40, n. 4, p. 249-59, 2004.

NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, vol.29, n.3, pp. 226-228, 2007.

NASCIMENTO, T.S.; PEREIRA, R.O.L.; MELLO, H.L.D.; COSTA, J. Metemoglobinemia: do Diagnóstico ao Tratamento. **Rev Bras Anesthesiol.**, Campinas, n. 58, v. 6, p. 651-664, 2008.

NOLAN, V.G.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRER, L.A. STEINBERG, M.H. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood**. v. 106, n. 9, p. 3264 – 3267, 2005.

ORKIN, S.H.; HIGGS, D.R. Sickle Cell Disease at 100 Years. **Science**, v. 329, 2010.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P.C.; SIQUEIRA, F.A. M., BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.22, n.2, pp. 111-121, 2000.

OWUSU-ANSAH, A.; IHUNNAH, C.A.; WALKER, A.L.; OFORI-ACQUAH, S.F. Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. **Transl Res.**, v.167, n. 1, p. 281-97, 2016.

REES, D.C; GIBSON, J.S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v.156, p.433–445, 2011.

RILEY, S. R.; BEN-EZRA, J. M.; TIDWELL, A. Reticulocyte enumeration: past & present. **Lab Med.**, v.32, p.599-608, 2001.

SHEEHAN, V.A.; LUO, Z.; FLANAGAN, J.M.; HOWARD, T.A.; THOMPSON, B.W.; WANG, W.C.; KUTLAR, A.; WARE, R.E. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. **American Journal of Hematology**. v. 88, n. 7, p. 571-576, 2013.

SILVA, L.B.; GONÇALVES, R.P.; RABENHORST, S.H.B. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **J Bras Patol Med La**, v. 45, n. 2, p. 115-118, 2009.

SILVA FILHO, I.L.; GONÇALVES, M. S.; ADÔRNO, E.V.; CAMPOS, D.P.; FLEURY, M.K. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 3, p. 183-187, 2005.

SIM, S.C.; KACEVSKA, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recente update on clinical implications and endogenous effects. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 13, 1 – 11, 2013.

STUART, M.L; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 364 October 9, 2004.

SAÚDE, 2014. **Doença Falciforme. O que se deve saber sobre herança genética.**

Disponível em:<

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_deve_saber_sobre_heranca.pdf>. Acesso em: 22 fev 2016. Brasília, 2014.

SAÚDE, 2015. **SUS fará transplante de medula óssea em pessoas com doença**

falciforme . Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/07/sus-fara-transplante-de-medula-ossea-em-pessoas-com-doenca-falciforme>>. Acesso em: 09 jan 2016.

STEINBERG, M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia.

ScientificWorldJournal, v. 18, n.9, p.46-67, 2009.

UDA, M.; GALANELLO, R.; SANNA, S.; LETTRE, G.; SANKARAN, V.G.; CHEN, W.; USALA, G.; BUSONERO, F.; MASCHIO, A.; ALBAI, G.; PIRAS, M.G.; SESTU, N.; LAI, S.; DEI, M.; MULAS, A.; CRISPONI, L.; NAITZA, S.; ASUNIS, I.; DEIANA, M.; NAGARAJA, R.; PERSEU, L.; SATTA, S.; CIPOLLINA, M.D.; SOLLAINO, C.; MOI, P.; HIRSCHHORN, J.N.; ORKIN, S.H.; ABECASIS, G.R.; SCHLESSINGER, D.; CAO, A. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**.v.105, n 5, p1620-5, 2008.

WAGENER, F.A.D.T.G.; EGGERT, A.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.; VERHOFSTAD, A.; ABRAHAM, N.G.; ADEMA, G.; VAN KOOYK, Y.; DE WITTE, T.; FIGDOR, C.G. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. **Blood**, v.98, n. 6, 2015.

WONG, T.E.; BRANDOW, A.M.; LIM, W.; LOTTENBERG, R. Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. **Blood**: v.124, n. 26, 2014.

XIE, H.G.; FRUEH, F.W. Pharmacogenetics steps toward personalized medicine. **Personalized Medicine**, v. 2, n.4., p.325-337, 2005.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v .29, n.3, p. 207-214, 2007.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Anemia Falciforme: Avaliação do dano endotelial e do DNA, NADPH-oxidase, marcadores de hemólise e moduladores genéticos

Pesquisador: ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão:

CAAE: 31516214.0.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 706.154

Data da Relatoria: 02/06/2014

Apresentação do Projeto:

A anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica hereditária causada por uma mutação pontual no gene da beta globina gerando uma hemoglobina anormal denominada de hemoglobina S (HbS), em homozigose. O quadro clínico da doença é extremamente variável em decorrência de múltiplos fatores, dentre eles a concentração de hemoglobina fetal (HbF), os haplótipos da beta globina e os polimorfismos BCL11A e HBS1L-MYB. Além disso, a AF apresenta um comprometimento na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um vasodilatador importante na fisiopatologia das crises de vaso-oclusão, comum na doença. A doença se caracteriza ainda por um processo inflamatório crônico, com aumento do estresse oxidativo, dano endotelial e um estado de hipercoagulabilidade. A hidroxiuréia (HU) é o fármaco utilizado no tratamento da AF por aumentar os níveis de HbF. Diante do exposto o projeto se propõe a determinar os polimorfismos BCL11A e HBS1L-MYB e os haplótipos da beta-globina e avaliar a NADPH-oxidase, o dano endotelial e do DNA e os marcadores de hemólise em pacientes com AF em estado estacionário. O estudo será do tipo transversal e analítico com 80 pacientes adultos com diagnóstico molecular de AF em estado estacionário. Um total de 50 indivíduos saudáveis serão utilizados como grupo controle. Os polimorfismos genéticos BCL11A e HBS1L-MYB serão determinados por PCR em

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 706.154

identificados; Dosar TNF-alfa e NF kappa B nos pacientes com AF; Associar as dosagens de NF kappa B com as dosagens de TNF-alfa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa possui riscos relacionados com a coleta das amostras de sangue nos participantes da pesquisa e quando da coleta de dados nos prontuários dos participantes estes relacionados com a privacidade dos dados e a confidencialidade

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é factível do ponto de vista de realização e pode ser incrementada após a aprovação do CEP. Por se tratar de estudo genético de polimorfismos não necessita de análise pela CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Está presente o TCLE redigido de forma adequada.

Existe um Termo de Fiel Depositário dos prontuários.

Demais documentos presentes.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto reúne condições para sua aprovação pelo CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deverá apresentar a este CEP/HUWC, relatório aoós término do estudo.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**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 “**Anemia Falciforme: Avaliação do dano endotelial e do DNA, NADPH-oxidase, marcadores de hemólise e moduladores genéticos**”, que tem como objetivo principal avaliar o dano endotelial e do DNA, NADPH-oxidase, marcadores de hemólise e moduladores genéticos em pacientes com Anemia Falciforme que são acompanhados no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC).

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 Cantídeo (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 Romélia Pinheiro Gonçalves, endereço para contato: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60430-370 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 33668264.

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 lidas 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: / /