



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISLARA RODRIGUES CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *BCL11A* E DOS GENES DE
REPARO DE FITA DUPLA DO DNA, *ATM* E *ATR*, EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME**

FORTALEZA

2018

ISLARA RODRIGUES CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *BCL11A* E DOS GENES DE
REPARO DE FITA DUPLA DO DNA, *ATM* E *ATR*, EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador: Dr^a. Juliana Cordeiro de Sousa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C364a Cavalcante, Islara Rodrigues.
AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE BCL11A E DOS GENES DE REPARO DE FITA DUPLA DO DNA, ATM E ATR, EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME / Islara Rodrigues Cavalcante. – 2018.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
Coorientação: Profa. Dra. Juliana Cordeiro de Sousa.
1. Anemia falciforme. 2. Gene BCL11A. 3. Gene ATM. 4. Gene ATR. 5. Polimorfismo. I. Título.
CDD 615
-

ISLARA RODRIGUES CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *BCL11A* E DOS GENES DE
REPARO DE FITA DUPLA DO DNA, *ATM* E *ATR*, EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito obrigatório à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dr^ª. Alcínia Braga de Lima Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

A Deus.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisca Gomes Rodrigues e Manoel Tibúrcio Cavalcante por sempre torcerem pelo meu sucesso.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes pela excelente orientação e pelos ensinamentos de vida.

À minha coorientadora Juliana Cordeiro de Sousa pela orientação, dedicação, empenho e paciência ao longo deste trabalho.

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

Ao Tarcísio Paulo de Almeida Filho, Marília Rocha Laurentino e Jamilly Florêncio Pereira pelo tempo disponibilizado e auxílio na elaboração deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. José Ajax Nogueira Queiroz e Prof^a. Alcínia Braga de Lima Arruda pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos funcionários do HEMOCE pela disponibilidade e ajuda nas coletas durante este trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“É coisa preciosa, a saúde, e a única, em verdade, que merece que em sua procura empreguemos não apenas o tempo, o suor, a pena, os bens, mas até a própria vida; tanto mais que sem ela a vida acaba por tornar-se penosa e injusta.” (Michel de Montaigne)

RESUMO

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença monogênica causada por uma mutação pontual no gene da β -globina que resulta na produção de uma hemoglobina S (HbS) anormal em homozigose. A AF é caracterizada por um processo inflamatório crônico, pelo aumento do estresse oxidativo e pelo *turnover* aumentado de células na medula óssea, os quais, juntamente com a hipóxia, têm sido associados à instabilidade genética e funcionam como um fator de risco para o desenvolvimento de alterações genéticas. Essa instabilidade pode surgir a partir de uma resistência a apoptose mediada por hipóxia e/ou através do comprometimento dos mecanismos de reparo do DNA, levando ao aumento das taxas de mutagênese. Deste modo, duas proteínas quinases a ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a ataxia telangiectasia Rad3 relacionada (ATR) exercem um importante papel, uma vez que, participam do mecanismo de reparo do dano de dupla fita do DNA. O principal agente farmacológico utilizado na AF é a Hidroxiuréia (HU) que aumenta a concentração de hemoglobina fetal (HbF), um modulador clínico da doença. Um importante gene associado a expressão de HbF é o gene *BCL11A* cujos polimorfismos estão associados à variações nas concentrações de HbF, podendo minimizar os eventos clínicos associados a doença. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo avaliar os polimorfismos dos genes *BCL11A* e dos genes de reparo de fita dupla (*ATM* e *ATR*), associando-os a dados laboratoriais e clínicos de pacientes com AF. Trata-se de um estudo transversal, analítico, com 125 pacientes com diagnóstico clínico e molecular de AF, com e sem uso de HU e em estado basal. As análises estatísticas foram realizadas através do *software* SPSS versão 20 e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A média de idade foi 33 anos, sendo a maioria do sexo feminino. Quanto ao efeito da HU, o volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) foram maiores ($p < 0,001$) nos pacientes sem uso de HU, enquanto que a leucometria e os neutrófilos apresentaram-se inferiores ($p = 0,029$) e houve uma associação com a úlcera de membros inferiores (MMI). Na análise do polimorfismo do gene *BCL11A*, a rs7557939, observou-se uma diminuição da HbF ($p = 0,0038$), VCM ($p < 0,001$) e HCM ($p = 0,030$) nos pacientes com genótipo A/A. A análise de covariância revelou uma associação entre a HbF, o VCM e o HCM e o tratamento com HU ($p < 0,05$). A análise univariada demonstrou uma associação com a presença de úlcera de MMI e a análise de regressão nominal multivariada mostrou que pacientes com o genótipo A/G apresentavam menor chance apresentarem úlcera ($p = 0,037$) e que o genótipo A/A se correlacionou com o aumento da chance de desenvolverem crises álgicas ($p < 0,001$). Na análise da rs4671393, verificou-se que os pacientes com o genótipo A/A apresentaram maior número de leucócitos ($p = 0,019$) e plaquetas ($p = 0,027$). A análise na rs1186868 não demonstrou influência sobre os

parâmetros analisados. Quanto as análises dos polimorfismos dos genes de reparo do DNA, o polimorfismo genético rs228593 do gene *ATM* revelou uma diminuição dos níveis de HbS ($p=0,023$) e do número de plaquetas ($p=0,018$) nos pacientes que apresentaram o genótipo G/A e A/A. Em contraste, foi encontrada um aumento a HbF ($p=0,010$) nesses mesmo pacientes. A análise do polimorfismo rs229032 do gene *ATR* não apresentou nenhuma associação com os parâmetros laboratoriais e clínicos. Desta forma, podemos concluir que tanto o polimorfismo do gene *BCL11A* quanto o polimorfismo do gene *ATM* apresentaram influencia como moduladores clínicos e laboratoriais na AF.

Palavras-chaves: Anemia falciforme. Gene BCL11A. Gene ATM. Gene ATR. Polimorfismo.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is a monogenic disease caused by a point mutation in the β -globin gene that results in the production of an abnormal hemoglobin S (HbS) in homozygous. PA is characterized by a chronic inflammatory process, increased oxidative stress, and increased cell turnover in the bone marrow, which together with hypoxia have been associated with genetic instability and function as a risk factor for the development of genetic alterations. This instability may arise from a resistance to hypoxia-mediated apoptosis and / or compromised DNA repair mechanisms, leading to increased mutagenesis rates. Thus, two protein kinases the mutated telangiectasia ataxia (TMJ) and related ataxia telangiectasia Rad3 (ATR) play an important role, since they participate in the mechanism of repair of double-stranded DNA damage. The main pharmacological agent used in AF is Hydroxyurea (HU), which increases the concentration of fetal hemoglobin (HbF), a clinical modulator of the disease. An important gene associated with HbF expression is the BCL11A gene whose polymorphisms are associated with variations in HbF concentrations, which may minimize clinical events associated with the disease. In this context, the study aimed to evaluate the polymorphisms of BCL11A gene and double-tape repair genes (ATM and ATR), associating them with laboratory and clinical data of patients with FA. This is a cross-sectional, analytical study with 125 patients with clinical and molecular diagnosis of AF, with and without HU and baseline. Statistical analyzes were performed using software SPSS version 20 and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The mean age was 33 years, the majority being female. The mean corpuscular volume (CVM) and mean corpuscular hemoglobin (HCM) were higher ($p < 0.001$) in patients without HU, whereas leukometry and neutrophils were lower ($p = 0.029$) and there was an association with lower limb ulcer (MMI). In the analysis of BCL11A polymorphism, rs7557939, there was a decrease in HbF ($p = 0.0038$), VCM ($p < 0.001$) and HCM ($p = 0.030$) in patients with A / A genotype. Covariance analysis revealed an association between HbF, VCM and HCM, and HU treatment ($p < 0.05$). The univariate analysis showed an association with the presence of MMI ulcer and the multivariate nominal regression analysis showed that patients with the A / G genotype were less likely to present an ulcer ($p = 0.037$) and that the A / A genotype correlated with the increase the chance of developing painful seizures ($p < 0.001$). In the analysis of rs4671393, it was verified that the patients with the A / A genotype showed a higher number of leukocytes ($p = 0.019$) and platelets ($p = 0.027$). The analysis on rs1186868 showed no influence on the analyzed parameters. Regarding analyzes of DNA repair gene polymorphisms, the rs228593 gene polymorphism of the ATM gene revealed a decrease in the levels of HbS ($p = 0.023$) and platelet count ($p = 0.018$) in patients who presented the G / A genotype and A / A.

In contrast, an increase in HbF ($p = 0.010$) was found in these same patients. The analysis of rs229032 polymorphism of the ATR gene showed no association with laboratory and clinical parameters. Thus, we can conclude that both the BCL11A gene polymorphism and the ATM gene polymorphism had influence as clinical and laboratory modulators in FA.

Keywords: Sickle cell anemia. Gene BCL11A. Gene ATM. Gene ATR. Polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Processo de polimerização da hemoglobina S e formação dos eritrócitos em foice	20
Figura 2	– Representação esquemática da localização do gene <i>BCL11A</i> no cromossomo 2	28
Figura 3	– Representação esquemática da localização do gene <i>ATM</i> no cromossomo 11	32
Figura 4	– Representação esquemática da localização do gene <i>ATR</i> no cromossomo 3	33
Figura 5	– Associação do polimorfismo do gene <i>BCL11A</i> na região rs7557939 com HbF	46
Figura 6	– Associação do polimorfismo do gene <i>BCL11A</i> na região rs7557939 com VCM	47
Figura 7	– Distribuição genotípica rs7557939 de acordo HCM	47
Figura 8	– Relação entre o polimorfismo rs4671393 do gene <i>BCL11A</i> e o número de leucócitos e plaquetas de pacientes com Anemia Falciforme	50
Figura 9	– Associação do polimorfismo rs228593 do gene <i>ATM</i> e a percentagem de hemoglobina fetal. Pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes possuem maior quantidade de hemoglobina fetal do que pacientes homozigotos selvagens	54
Figura 10	– Associação do polimorfismo rs228593 do gene <i>ATM</i> e a percentagem de hemoglobina falciforme (F). Pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes possuem menor quantidade de hemoglobina fetal do que pacientes homozigotos selvagens	55
Figura 11	– Associação do polimorfismo rs228593 do gene <i>ATM</i> e o número de plaquetas. Pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes possuem menor quantidade de plaquetas do que pacientes homozigotos selvagens	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Genes e polimorfismos dos genes estudados e sonda <i>Taqman</i> ®.....	41
Tabela 2	– Lista de testes estatísticos de associação realizados para cada polimorfismo e variável	41
Tabela 3	– Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme	43
Tabela 4	– Relação entre o tratamento com hidroxiuréia e os parâmetros clínicos analisados	44
Tabela 5	– Relação entre a hidroxiuréia e os parâmetros laboratoriais	44
Tabela 6	– Frequência genotípica dos gene <i>BCL11A</i> em pacientes com Anemia Falciforme.....	45
Tabela 7	– Relação entre o polimorfismo rs7557939 do gene <i>BCL11A</i> e os parâmetros laboratoriais nos pacientes com Anemia Falciforme	46
Tabela 8	– Relação entre o polimorfismo rs7557939 do gene <i>BCL11A</i> e os parâmetros clínicos dos pacientes com Anemia Falciforme	48
Tabela 9	– Regressão logística multinominal para associar as ocorrências de crises álgicas ao SNP rs7557939	49
Tabela 10	– Relação entre o polimorfismo rs4671393 do gene <i>BCL11A</i> e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme	49
Tabela 11	– Relação entre o polimorfismo rs4671393 do gene <i>BCL11A</i> e os parâmetros clínicos dos pacientes com Anemia Falciforme	50
Tabela 12	– Relação entre o polimorfismo rs1186868 do gene <i>BCL11A</i> e os parâmetros laboratoriais nos pacientes com Anemia Falciforme.....	51
Tabela 13	– Relação entre o polimorfismo rs1186868 do gene <i>BCL11A</i> e os parâmetros clínicos nos pacientes com Anemia	52
Tabela 14	– Frequência genotípica dos genes <i>ATM</i> e <i>ATR</i> em pacientes com Anemia Falciforme.....	53
Tabela 15	– Relação entre o polimorfismo rs228593 do gene <i>ATM</i> e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme	54
Tabela 16	– Relação entre o polimorfismo rs228593 do gene <i>ATM</i> e os parâmetros clínicos nos pacientes com Anemia Falciforme	56
Tabela 17	– Relação entre o polimorfismo rs2229032 do gene <i>ATR</i> e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme	57

Tabela 18	–	Relação entre o polimorfismo rs2229032 do gene <i>ATR</i> e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme	57
-----------	---	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetilarginina Assimétrica
AF	Anemia Falciforme
AP-1	Proteína ativadora -1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Ataxia Telangiectasia Rad3-relacionada
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCL11A	Linfoma de células B / leucemia 11A
BER	Reparo por excisão de bases
BH4	tetrahidrobiopterina
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DACT	Departamento de Análises Toxicológicas
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DDR	Resposta ao dano de DNA
DFD -	Dano de fita dupla
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
EROs	Espécie reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
Fe ⁺³	Estado férrico
FFOE	Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HBG	Gene Globínico Fetal
HbS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HF	Hemoglobina fetal
HR	Recombinação homóloga
HU	Hidroxiuréia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
ICAM1	Moléculas de adesão intracelular 1
IL-1 β	Interlucina-1 β

IL-6	Interlucina-6
IL-8	Interleucina-8
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LPHGDH	Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas
MetHb	Meta-hemoglobina
MMI	Membros inferiores
MMR	Reparo de erros de emparelhamento entre base
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NET	Redes Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear Kapa-Beta
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ⁻³	Nitrato
O ₂ ⁻	Íons superóxido
[·] OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PI3K	Proteínas fosfatidilinositol 3-quinases
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STA	Síndrome torácica aguda
TLR-4	Receptor Toll-like 4
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Radiação Ultravioleta
VCAM1	Moléculas de adesão vascular 1
VCM	Volume Corpuscular Médio
XD DESIDROGENASE	Xantina Desidrogenase
XO	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Anemia Falciforme	18
1.2	Epidemiologia	18
1.3	Fisiopatologia	19
1.3.1	<i>Mecanismos gerais da doença</i>	19
1.3.2	<i>Estresse Oxidativo</i>	21
1.3.3	<i>Liberção de heme e hemoglobina no plasma</i>	22
1.3.4	<i>Depleção de NO e arginase-1</i>	23
1.3.5	<i>Interao das células sangüneas com o endotélio vascular e injúria de isquemia e reperfusão</i>	24
1.3.6	<i>Processo inflamatório na Anemia Falciforme</i>	25
1.4	Clínica na AF	27
1.5	Hemoglobina Fetal	27
1.6	Gene <i>BCL11A</i>	28
1.7	Polimorfismos do <i>BCL11A</i>	29
1.8	Hidroxiúria	29
1.9	Mecanismos de Reparo Dano de DNA	30
1.10	Genes Ataxia Telangiectasia Mutada (<i>ATM</i>) e Ataxia Telangiectasia Rad3-relacionada (<i>ATR</i>)	31
1.11	Polimorfismo dos genes <i>ATM</i> e <i>ATR</i>	34
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivos gerais	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Desenho do estudo	38
3.2	Local de pesquisa	38
3.3	População do estudo	38
3.3.1	<i>Crítérios de Inclusão</i>	38
3.3.2	<i>Crítérios de Exclusão</i>	39
3.4	Coleta de dados	39
3.5	Coleta de amostras	39
3.6	Análises moleculares	39
3.6.1	<i>Processo de lise dos leucócitos</i>	39
3.6.2	<i>Extração de DNA das amostras de sangue periférico</i>	39
3.6.3	<i>Quantificação do DNA</i>	40

3.6.4	<i>Análise dos polimorfismos dos genes BCL11A, ATM E ATR</i>	40
3.7	Análise Estatística	41
3.8	Aspectos Éticos	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Análises dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais	43
4.2	Análises do Polimorfismo do gene BCL11A	45
4.2.1	<i>Influência do polimorfismo do gene BCL11A na região rs7557939 sobre os parâmetros laboratoriais e clínicos</i>	45
4.2.2	<i>Influência do polimorfismo do gene BCL11A na região rs4671393 sobre os parâmetros laboratoriais e clínicos</i>	49
4.2.3	<i>Influência do polimorfismo do gene BCL11A na região rs1186868 sobre os parâmetros clínicos do paciente com Anemia Falciforme</i>	51
4.3	Análise dos polimorfismos dos genes de reparo ATM e ATR em pacientes com Anemia Falciforme	53
4.3.1	<i>Influência do polimorfismo do gene ATM na região rs228593 sobre os parâmetros clínicos do paciente com Anemia Falciforme</i>	53
4.3.2	<i>Influência do polimorfismo do gene ATR na região rs2229032 sobre os parâmetros clínicos do paciente com Anemia Falciforme</i>	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLACIDO – BCL11A, ATM E ATR	71
	ANEXO A – PARECERES COMITÊ DE ÉTICA	73
	ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO	78
	ANEXO C – COMPROVANTE DE ENVIO DO ARTIGO	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia Falciforme

A Anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica genética, caracterizada pela presença da hemoglobina S (HbS) em homozigose. A formação da HbS decorre de uma mutação pontual no cromossomo 11, posição 6 da extremidade N-terminal da cadeia β da globina. Nessa mutação ocorre uma modificação na sequência do códon GAG para GTG, sendo traduzido o aminoácido ácido glutâmico no lugar da valina (SOUZA *et al*, 2016).

Essa pequena modificação estrutural é responsável por profundas alterações nas propriedades físico-químicas da molécula de hemoglobina no estado desoxigenado, pois forma-se um número considerável de moléculas agregadas que geram longos polímeros, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de “foice”, daí o nome falciforme. (STUART; NAGEL, 2004; ZAGO; PINTO, 2007; MANFREDINI *et al*, 2013).

Os primeiros registros desta doença foram descritos por Herrick em 1910 em um rapaz proveniente de Granada (HERRICK, 2001), entretanto, acredita-se que a mutação surgiu em pelo menos três ocasiões independentes no continente africano, referidas como haplótipos de β -globina e nomeadas após as áreas em que foram descritas pela primeira vez: Benin, Senegal e República Centro-Africana ou Bantu. A origem da HbS no Brasil se deve principalmente aos indivíduos das regiões da África Ocidental e do Sul-Central que migraram em decorrência da guerra e do comércio de escravos, para o nosso país, dando início a uma população com diferentes origens étnicas e com diversificados graus de miscigenação (OKUMURA, LOBO, BONINI-DOMINGOS, 2013; SERJEANT, 2013; MANFREDINI *et al.*, 2013).

1.2 Epidemiologia

No Brasil, estima-se que 25 mil a 50 mil pessoas tenham a doença (HbSS) e que 4% da população brasileira possua o traço falciforme (heterozigotos) (SAÚDE,2011). Em 2016, foram diagnosticados 1.071 casos novos da doença através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (SAÚDE, 2012). A AF apresenta maior prevalência nas Regiões Norte e Nordeste, sendo que a maior parte dos pacientes estão na Bahia, devido ao alto número de afrodescendentes, com um caso a cada 500 nascimentos (SAÚDE, 2011).

1.3 Fisiopatologia

1.3.1 Mecanismos gerais da doença

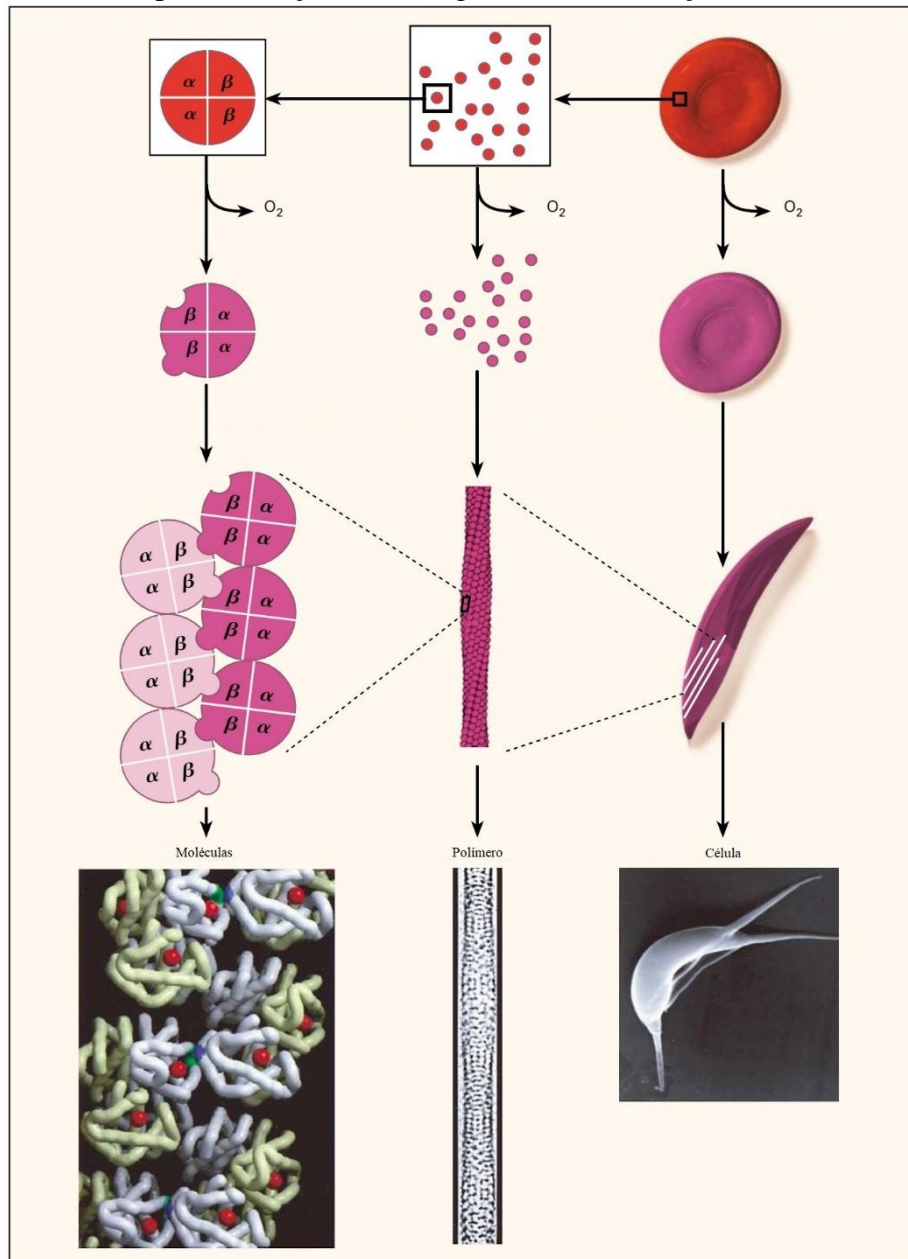
A HbS é produzida a partir de uma mutação no décimo sétimo nucleotídeo do gene *β-globina*, essa mutação consiste na substituição de uma timina por uma adenina, que resulta na troca de um ácido glutâmico por uma valina na sexta posição da cadeia β da hemoglobina (BUNN, 1997). Uma vez desoxigenada, a HbS é capaz de interagir, através de interações hidrofóbicas, com outras moléculas de hemoglobina, promovendo, assim, a formação de núcleos de polímeros que posteriormente crescem dentro do eritrócito (polimerização da HbS), resultando na perda de sua arquitetura e flexibilidade (BUNN, 1997). Os eritrócitos contendo HbS polimerizada adquirem uma forma alongada semelhante a uma “foice” a qual é ilustrada na Figura 1. Esse processo é reversível quando os eritrócitos são reoxigenados, restaurando sua forma normal através da quebra dos polímeros de HbS (WARE *et al.*, 2017).

Três fatores exercem influência sobre a taxa e a extensão da polimerização da HbS na circulação, são eles: o grau de desoxigenação celular, a concentração de HbS intracelular e a presença ou ausência de hemoglobina fetal (HbF), a qual é capaz de inibir o processo de polimerização em parte devido aos seus resíduos de glutamina que previnem o contato lateral crítico na dupla fita das fibras de HbS e em parte devido à redução efetiva da concentração de HbS no eritrócito (BUNN, 1997; NAGEL *et al.*, 1979; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

O processo de polimerização da HbS é o evento fisiopatológico primário, sendo considerado o principal determinante da gravidade da doença (NOGUCHI; SCHECHTER; 1981; BRITTENHAM; SCHECHTER; NOGUCHI, 1985). Como resultado do processo contínuo e cíclico de falcização decorrente da formação e degradação do polímero de HbS, ocorre dano na membrana o que promove a desidratação, um fenômeno que torna os eritrócitos mais densos, rígidos e muitas vezes com morfologia irreversivelmente alterada, mantendo seu formato de “foice” mesmo na presença de quantidades adequadas de oxigênio (BRUGNARA, 1995; BUNN, 1997; KATO *et al.*, 2018).

Por serem mais rígidas, essas células são mais susceptíveis a hemólise intravascular e capazes de obstruir pequenos vasos da circulação, resultando em comprometimento da oferta de oxigênio e consequente hipóxia tecidual (WARE *et al.*, 2017; KATO *et al.*, 2018). Essa desidratação acelerada *in vivo* é a consequência fisiopatológica mais relevante da lesão da membrana nos eritrócitos SS e, como citado acima, pode contribuir para os aspectos hemolíticos e vaso-oclusivos da doença, que são os dois maiores processos fisiopatológicos responsáveis pelas manifestações clínicas (BUNN, 1997; REES, WILLIAMS, GLADWIN, 2010).

Figura 1 – Processo de polimerização da hemoglobina S e formação dos eritrócitos em foice.



Fonte: Adaptado de Bunn (1997). Legenda: A figura mostra eritrócitos atravessando a microcirculação e liberando o oxigênio a partir da oxihemoglobina (círculos vermelhos), gerando, assim, a desoxihemoglobina (círculos roxos). Na forma de círculo plano, o tetrâmero formado por $\alpha_2\beta_2$ (hemoglobina S) é mostrado no diagrama à esquerda. Após a desoxigenação da hemoglobina S, ocorre uma interação entre os tetrameros $\alpha_2\beta_2$ (roxo escuro) e os tetrameros de outras moléculas de hemoglobina (roxo claro), induzindo, assim, a formação de polímeros e, conseqüentemente, alterando a conformação dos eritrócitos. Estes são mostrados no diagrama à direita da figura juntamente com uma micrografia eletrônica de varredura de uma célula reversivelmente falciforme na porção inferior. O diagrama do meio mostra uma representação das fibras de hemoglobina S e, na porção inferior, uma micrografia eletrônica de alta resolução das fibras.

Além dessas alterações provocadas pela polimerização da HbS que resultam nos eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, outras anormalidades a nível celular contribuem para o mecanismo fisiopatológico da doença (KATO *et al.*, 2018).

1.3.2 Estresse Oxidativo

A hemólise é tanto causa como o efeito do estresse oxidativo (KATO *et al.*, 2018). Elevados níveis de estresse oxidativo, iniciado pelo processo de auto-oxidação da HbS e que culmina na produção de espécie reativas de oxigênio (EROs), podem interferir com o equilíbrio redox no interior dos eritrócitos falciformes, exacerbando a auto-oxidação da HbS, induzindo a instabilidade da membrana celular, provocando o envelhecimento prematuro dos eritrócitos e acelerando a hemólise intravascular (ALAYASH, 2018). O estresse oxidativo também pode: 1) oxidar proteínas de membrana revelando antígenos que se ligam a anticorpos existentes; 2) alterar o padrão assimétrico de fosfolipídios da bicamada lipídica dos eritrócitos, expondo fosfatidilserina na sua superfície (KUYPERS, 2007; KATO *et al.*, 2018). Ambas as alterações são reconhecidas pelos macrófagos e sinalizam para a eliminação desses eritrócitos por fagocitose, uma via de hemólise extravascular (KUYPERS, 2007; KATO *et al.*, 2018).

O processo de auto-oxidação da hemoglobina acontece durante a reoxigenação dos eritrócitos SS, período no qual há maior produção de radicais livres (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Nessa fase, o contato do oxigênio com o heme leva a sua auto-oxidação culminando na formação de metahemoglobina (metHb) e na geração concomitante de EROs via íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CHIRICO; PIALOUX, 2012; ALAYASH, 2018). O H_2O_2 , quando exposto à metHb, decompõe a hemoglobina e libera ferro, o qual pode reagir com o H_2O_2 remanescente para produzir o radical hidroxila ($\cdot OH$), o mais reativo e prejudicial das espécies reativas (CHIRICO; PIALOUX, 2012; ALAYASH, 2018). Embora a HbA (hemoglobina A) e a HbS possam sofrer auto-oxidação, esta é cerca de 1,7 vezes mais rápida na HbS do que na HbA (CHIRICO; PIALOUX, 2012; ALAYASH, 2018).

Ademais, ao contrário da HbA, que pode conter essa reação formando subprodutos inofensivos, a HbS pode tornar-se sobrecarregada pela fonte contínua de superóxido e, por meio de sua desmutação, o H_2O_2 (CHIRICO; PIALOUX, 2012; ALAYASH, 2018). Como resultado final, as células falciformes acabam gerando cerca de duas vezes mais quantidades de superóxido, H_2O_2 e $\cdot OH$ do que a HbA (CHIRICO; PIALOUX, 2012; ALAYASH, 2018). Outros mecanismos de produção de EROs também têm sido sugeridos, tais como: aumento da expressão de oxidases (xantina desidrogenase, xantina oxidase e NADPH oxidase), heme e Hb extracelular e o processo recorrente de isquemia-reperfusão nos tecidos (WOOD; GRANGER, 2007; ASLAN; FREEMAN, 2007).

Além do aumento dos oxidantes, o estresse oxidativo é caracterizado, também, por um esgotamento das defesas antioxidantes, tais como: superóxido dismutase,

peroxirredoxina 2, peroxirredoxina 4 e glutathiona reduzida endógena, os quais provavelmente atuam como um fator adicional que contribui para a hemólise (KATO *et al.*, 2018).

1.3.3 Liberação de heme e hemoglobina no plasma

A Hb e o heme liberados na circulação, como resultado da hemólise, também podem sofrer auto-oxidação, levando a produção de íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KATO *et al.*, 2018). O ferro contido nessas substâncias está disponível para reagir com essas EROs (reação de Fenton) produzindo o radical $\cdot OH$. Desta forma, a Hb e o heme liberados na circulação funcionam como uma fonte de estresse oxidativo, o qual podem causar danos em lipídios, proteínas e DNA (BEERS; WIJK, 2018). Por ser lipossolúvel, o heme livre no plasma pode, ainda, entrar em compartimentos celulares e causar danos teciduais (BEERS; WIJK, 2018).

Outro efeito tóxico associado a essas substâncias, é a capacidade de causar hemólise. A hemina, um produto da oxidação do heme formada pelo complexo de protoporfirina mais ferro no estado férrico (Fe^{+3}), prejudica a capacidade da membrana eritrocitária de manter o gradiente iônico, levando a perda de potássio e consequente tumefação decorrente da entrada de água, a qual ocorre devido ao gradiente osmótico criado pela Hb e outras moléculas contidas no interior dos eritrócitos, induzindo, assim, a hemólise por um mecanismo coloidosmótico (CHOU; FITCH, 1981).

A Hb livre no plasma também é capaz de depletar o óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador (KATO *et al.*, 2018). A reação da desoxi-HbS e da oxi-HbS com NO leva a uma diminuição da sua biodisponibilidade através de sua participação em diferentes reações com a molécula de Hb (CHIRICO; PIALOUX, 2012). A ligação do NO com a desoxi-Hb leva a formação de um complexo estável de $Fe^{+2}Hb-NO$, o qual pode reagir prontamente nas reações de Fenton e gerar EROs. Em contrapartida, a ligação do NO com a oxi-Hb leva a formação de metHb e nitrato (NO^{-3}) (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Dessa forma, essas reações levam a uma redução na biodisponibilidade do NO provocando disfunção vascular, vasoconstrição, ativação de células endoteliais e de plaquetas (KATO *et al.*, 2018).

Com citado acima, a Hb e o heme liberados na circulação são capazes de interagir com o endotélio vascular, causando danos e, conseqüentemente, lesão inflamatória nas células endoteliais (WAGENER *et al.*, 2001). O heme livre no plasma ainda provoca, através da geração de EROs, a expressão de moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM1), moléculas de adesão vascular 1 (VCAM1) e E-selectina sobre as células endoteliais, resultando na ligação de células sanguíneas ao endotélio vascular, o qual é uma das *hallmarks* da inflamação

(WAGENER, 2001; KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2005; BELCHER *et al.*, 2010). Dessa forma, os processos hemolíticos, com conseqüente liberação de Hb e heme, podem contribuir para eventos vaso-oclusivos da doença através da indução de moléculas de adesão e adesão de células sanguíneas ao endotélio (WAGENER *et al.*, 2001). A hemina também é uma substância pró-inflamatória capaz de ativar a explosão oxidativa causando quimiotaxia de neutrófilos através da estimulação da produção de IL-8 (GRACA-SOUZA *et al.*, 2002).

1.3.4 Depleção de NO e arginase-1

O NO é o principal fator de relaxamento derivado do endotélio na fisiologia normal e exerce um papel central na homeostase vascular pela manutenção do tônus vasomotor basal, limitando a agregação plaquetária, a lesão de isquemia-reperfusão, modulando a proliferação endotelial e regulando a adesão e o fluxo sanguíneo (REITER; GLADWIN, 2003; CHIRICO; PIALOUX, 2012).

Nos pacientes com doença falciforme tem sido relato uma diminuição da biodisponibilidade do NO tanto pela diminuição da produção como pelo aumento do seu consumo (CHIRICO; PIALOUX, 2012). A depleção de NO ocorre através de três vias, são elas: 1) via aumento de radical superóxido, 2) produtos da hemólise (heme livre, arginase e ADMA) e 3) através do desacoplamento da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (CHIRICO; PIALOUX, 2012).

A primeira via resulta na formação de um produto que é mais danoso do que os componentes que lhes deram origem. Nessa reação, o $O_2^{\cdot-}$ e o NO reagem formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), um composto altamente reagente e com potente ação oxidante (CHIRICO; PIALOUX, 2012). O $ONOO^-$ também pode formar, através de sua decomposição em pH fisiológico, o radical $\cdot OH$ e o dióxido de nitrogênio (NO_2), outros dois potentes agentes oxidantes (BECKMAN *et al.*, 1994; CHIRICO; PIALOUX, 2012). Essas reações são duplamente prejudiciais, uma vez que, diminuem a biodisponibilidade de NO, o qual exerce efeito protetor sobre a endotélio vascular, e contribuem para a formação de EROs, os quais são potencialmente danosos (REITER; GLADWIN, 2003; CHIRICO; PIALOUX, 2012).

Parte do mecanismo da segunda via de depleção do NO está associado com a reação do NO com as moléculas de Hb liberadas na circulação durante a hemólise. O NO também pode ser depletado a partir da competição entre a NOS e a arginase-1 pela L-arginina, o substrato necessário para a produção de NO pela NOS. Como resultado da hemólise, a arginase-1 é liberada no meio extracelular convertendo a L-arginina em ornitina, que contribui para a síntese de poliaminas, promove a proliferação celular, potencialmente de células vasculares,

provavelmente promovendo o remodelamento vascular (CHIRICO; PIALOUX, 2012; KATO *et al.*, 2018). Ainda durante a hemólise, ocorre liberação de dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da NOS o qual é abundante nos eritrócitos. A ação combinada da arginase-1 e do ADMA pode contribuir para depleção de NO por desacoplamento da NOS, a terceira via de depleção do NO (KATO *et al.*, 2018).

A terceira via de depleção do NO está associada ao desacoplamento da eNOS (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Essa enzima é formada por dois domínios, um redutase e outro oxigenase, sendo este último responsável pela produção do NO (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Em condições normais, o domínio oxigenase da eNOS recebe elétrons a partir da tetrahidrobiopterina (BH4) e os transfere para a L-arginina, iniciando, dessa forma, o processo de oxidação da L-arginina que culmina na produção de NO e L-citrulina. No entanto, quando há uma deficiência de BH4, por exemplo, pela sua inativação pelo ONOO⁻ o qual esta aumentado na doença falciforme ou quando há deficiência de L-arginina provocada pelo aumento do consumo devido a liberação de arginase-1 liberada durante a hemólise, a transferência de elétrons para a L-arginina é interrompida levando ao desacoplamento da eNOS com consequente produção de superóxido (EROs) em vez de NO (VÁSQUEZ-VIVAR *et al.*, 1998; CHIRICO; PIALOUX, 2012; KATO *et al.*, 2018).

1.3.5 Interação das células sanguíneas com o endotélio vascular e injúria de isquemia e reperfusão

A interação das células sanguíneas com o endotélio vascular decorre da contribuição de diferentes fatores, tais como: a biodisponibilidade diminuída do NO, a hemólise, as EROs e a inflamação (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Esses fatores contribuem, direta ou indiretamente, para o aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina), os quais aumentam a adesão dos eritrócitos falciformes e dos leucócitos as células endoteliais (WAGENER, 2001; KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2005; CHIRICO; PIALOUX, 2012). A hemólise e os leucócitos ativados, particularmente os neutrófilos, são fontes de EROs (GRACA-SOUZA *et al.*, 2002; KATO *et al.*, 2018). Também tem sido mencionado uma diminuição das defesas antioxidantes nos pacientes com doença falciforme o que contribui para exacerbar o estresse oxidativo (KATO *et al.*, 2018). O excesso de EROs provocado por esses fatores pode, então, ativar fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 que promovem a expressão de moléculas de adesão e consequente ligação dos eritrócitos e leucócitos ao endotélio, podendo levar a oclusão vascular e isquemia tecidual (BELCHER *et al.*, 2010). Como citado, o NO também está associado à interação das células sanguíneas com

o endotélio vascular. Este parece exercer seus efeitos através da inibição do fator de transcrição NF- κ B que é necessário para a expressão de moléculas de adesão (SPIECKER; PENG; LIAO, 1997; SPIECKER, 1998).

A interação das células sanguíneas com o endotélio leva a oclusão vascular e, conseqüentemente, a isquemia tecidual, desencadeando a perda de ATP que, depois de metabolizado, resulta na sua conversão em hipoxantina e xantina que, por sua vez, se acumulam nos tecidos. Esse evento é seguido pelo acúmulo de cálcio citosólico, disfunção mitocondrial, tumefação celular e morte celular por mecanismos inflamatórios (necrose) e não inflamatórios (autofagia). Concomitantemente e sob condições de hipóxia, a xantina desidrogenase (XD), uma enzima presente em grande quantidade nas células endoteliais, é convertida a xantina oxidase (XO). Esta é liberada para o meio extracelular e, quando o fluxo sanguíneo é restabelecido (reperfusão), catalisa a reação entre a hipoxantina acumulada durante a hipóxia e o O₂ proveniente da reperfusão, resultando na produção de ácido úrico, NADPH e O₂⁻. Dependendo da biodisponibilidade do ferro, esse processo permite a geração de outras ERO. Assim, a XO é entendida como sendo, em grande parte, responsável explosão oxidativa que se acredita iniciar o processo de isquemia-reperfusão (CHIRICO; PIALOUX, 2012; HEBBEL, 2014).

1.3.6 Processo inflamatório na Anemia Falciforme

A inflamação na AF é decorrente de múltiplos mecanismos, no entanto existem 4 eventos importantes na fisiopatologia da doença que provocam o início do processo inflamatório, são eles: a hemólise, as alterações na membrana eritrocitária, a injúria de isquemia-reperfusão e o estresse oxidativo (DE ALMEIDA; KATO; CONRAN, 2016).

A hemólise é caracterizada pela liberação de Hb que contribui para a diminuição da biodisponibilidade NO o qual tem muitos efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a ativação de leucócitos, a interação leucócito-endotélio e o estresse oxidativo (DE ALMEIDA; KATO; CONRAN, 2016). Além disso, o NO atua inibindo a agregação plaquetária e modulando a produção de alguns mediadores inflamatórios como TNF- α (ALMEIDA; KATO; CONRAN, 2016). Outra consequência da hemólise é a liberação de hemina, uma substância que é capaz de produzir EROs, os quais são potencialmente danosos e podem ter efeitos inflamatórios (DE ALMEIDA; KATO; CONRAN, 2016; BEERS; WIJK, 2018). O heme e a hemina podem, também, interagir com receptores *toll-like* 4 (TLR4) e induzir a expressão moléculas de adesão via ativação do fator de transcrição NF- κ B (DE ALMEIDA; KATO; CONRAN, 2016).

As alterações de membrana, tais como a desidratação, contribuem para a inflamação visto que esse evento altera a expressão de moléculas de adesão nos eritrócitos falciformes, favorecendo, assim, a interação e a adesão dos eritrócitos com outros tipos celulares (DE ALMEIDA; KATO; CONRAN, 2016). As alterações intracelulares e na membrana dos eritrócitos provocadas pela polimerização da HbS podem alterar o equilíbrio redox, ativar o sistema do complemento e de coagulação, fatores que podem contribuir para processos inflamatórios (CONRAN; BELCHER, 2018). Várias dessas moléculas de adesão têm sua expressão aumentada em eritrócitos de pacientes com AF, tais como: $\alpha_4\beta_1$ (CD49d/CD29; VLA-4), CD36, ICAM-4 e a molécula de adesão celular Lutheran/basal (Lu/BCAM) (JONECKIS *et al.*, 1993; COLIN; LE VAN KIM; EL NEMER, 2014). O processo contínuo de polimerização da HbS pode contribuir para inflamação através da formação de espículas nos eritócitos que, devido a alterações na malha de espectrinactina, podem se desprender da bicamada lipídica, permitindo a subsequente liberação de microvesículas, as quais transportam grandes quantidades de hemoglobina, heme e ferro que podem causar danos as células endoteliais com consequente lesão vascular. Essas microvesículas podem induzir ainda a produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β a partir de monócitos (CONRAN; BELCHER, 2018).

Na AF a vaso-oclusão leva a injúria de isquemia-reperfusão, induzindo a morte celular e consequente liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) tais como o HMGB1. Este promove, via TLR-4, a liberação de redes extracelulares de neutrófilos (NET), que são constituídas por cromatina condensada e enzimas granulares e que podem causar danos as células endoteliais e aos tecidos parenquimais (GUPTA *et al.*, 2010; SAFFARZADEH *et al.*, 2012; CONRAN; BELCHER, 2018). O ATP liberado de células necróticas devido ao processo de isquemia funciona como uma molécula sinalizadora através da ativação dos receptores purinérgicos P2. A ligação do ATP ao receptor purinérgico P2X7 leva a efluxo de K⁺ através da abertura do canal catiônico controlado por ATP e pode contribuir para a ativação do NLRP3 e a formação do inflamassoma (CONRAN; BELCHER, 2018). Quando o fluxo sanguíneo é restabelecido após a isquemia mais danos podem ocorrer devido a produção de EROs e sobrecarga de cálcio. Ademais, pode ocorrer ativação de células iNKT as quais podem contribuir para cascata inflamatória induzidas pela quimiocinas IFN- γ (CONRAN; BELCHER, 2018).

A inflamação também pode ser induzida pelo estresse oxidativo o qual se origina através de vários mecanismos na AF. As EROs atuam como segundos mensageiros para as vias de sinalização associadas à morte celular, dano, ativação endotelial e inflamação. Alguns

estudos sugerem que as EROs podem ativar NLRP3 e mediar a ativação do inflamassoma (ABAIS *et al.*, 2014; VAN GOLEN; VAN GULIK; HEGGER, 2012).

1.4 Clínica na AF

A polimerização da HbS, a vaso-oclusão e os eventos hemolíticos desempenham um importante papel na fisiopatologia da doença falciforme, sendo responsáveis, também, por desencadear uma série de eventos que culminam no aparecimento de outras complicações. Esses eventos incluem disfunção endotelial vascular, deficiência funcional de NO, inflamação, estresse oxidativo, lesão de reperfusão, hipercoagulabilidade, aumento da adesividade dos neutrófilos e ativação plaquetária (REES; WILLIAMS GLADWIN, 2010). A interação entre esses eventos e sua relação com o aparecimento de outras complicações é pouco entendido, contudo parecem contribuir de forma diferente para o surgimento de uma determinada complicação. De modo geral, essas complicações podem ser divididas em dois grandes grupos: os relacionados à vasculopatias e com a severidade da hemólise (doença cerebrovascular, hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna e retinopatia) e os relacionados à isquemia dos órgãos (dor aguda, hiposplenismo, insuficiência renal, doença óssea, síndrome torácica aguda e dano hepático) (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; MINNITI *et al.*, 2010; WARE *et al.*, 2017)

1.5 Hemoglobina Fetal

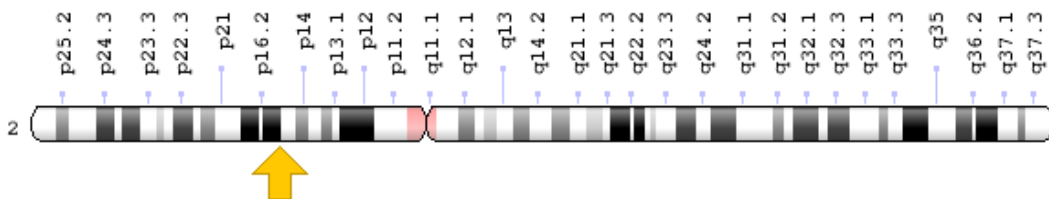
A HbF é o mais importante modulador das características clínicas e hematológicas dos pacientes com AF e o seu aumento está associado a diminuição dos episódios de dor aguda, das úlceras de perna, da osteonecrose, da síndrome torácica aguda, da severidade e mortalidade da doença (AKINSHEYE *et al.*, 2011). Apesar de seus benefícios, algumas manifestações apresentam pouca ou nenhuma associação com os níveis de HbF, são elas: priapismo, excreção de albumina urinária, acidente vascular encefálico, infarto cerebral silencioso e pressão sanguínea sistêmica (AKINSHEYE *et al.*, 2011). Akinsheye *et al.* (2011) sugerem que esta diferença pode estar relacionada a eventos fisiopatológicos que impacta na possibilidade de desenvolvimento dessas complicações. Estudos contidos em uma revisão publicada por Kato, Gladwin e Steinberg (2007) sugerem que as complicações decorrentes da vaso-oclusão e a viscosidade sanguínea são fortemente relacionadas a concentração de HbF, enquanto as condições consequentes a hemólise são menos influenciadas. A úlcera de perna, uma complicação da hemólise, é uma exceção a essa hipótese, uma vez que a HbF está associada a melhora desta (KOSHY *et al.*, 1989; NOLAN *et al.*, 2006).

1.6 Gene *BCL11A*

O mecanismo que influencia no processo de polimerização da HbS é bem caracterizado, porém a explicação para a heterogeneidade fenotípica e a ampla variabilidade clínica na AF permanece desconhecida. Vários são os fatores identificados como moduladores da clínica na AF, entre eles: a concentração de HbF, os grupos de haplótipos da beta globina e os polimorfismos do gene *BCL11A* (LETTRE *et al.*, 2008).

O gene *BCL11A* está localizado no cromossomo 2 (2p16) e codifica a proteína BCL11A, o qual foi descrito como um importante regulador da expressão gênica da HbF. Este é capaz de reprimir a expressão do gene da γ -globina diretamente por interação com elementos cis-reguladores (fatores de transcrição da linhagem retinóide) dentro do *cluster* do gene da β -globina ou, indiretamente, modulando vias celulares que afetam a expressão de HbF. (SANKARAM *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2016).

Figura 2 - Representação esquemática da localização do gene *BCL11A* no cromossomo 2



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCL11A>

O gene *BCL11A* tem sido associado como o principal agente repressor do gene HBG (gene globínico fetal), sendo sua expressão inversamente correlacionada à expressão do gene da γ -globina nas células eritroides em diferentes estágios de desenvolvimento. Nos progenitores eritroides, o fator de transcrição BCL11A interage fisicamente com o complexo remodelador de cromatina NuRD, e os fatores de transcrição eritroides, GATA1 e FOG1. Quando os níveis de HbF estão elevados, a expressão de *BCL11A* é reduzida (SANKARAM *et al.*, 2008).

1.7 Polimorfismos do *BCL11A*

A concentração de hemoglobina fetal (HbF) é herdada como uma característica quantitativa e é de enorme relevância clínica, dado o seu papel na melhoria da gravidade dos principais distúrbios da AF e β -talassemia (SANKARAN *et al.*, 2008).

O fator de transcrição *BCL11A* é um mediador central do silenciamento de γ -globina e, conseqüentemente, da troca de HbF para HbA (SANKARAN *et al.*, 2008). Estudos mostram

que polimorfismos no gene promotor γ^G -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. Destes três *Quantitative Trait Locus* (QTL), o gene *BCL11A* tem sido mais fortemente correlacionado à expressão de HbF (CARDOSO *et al.*, 2014; BHANUSHALI, 2015).

Foi demonstrado que, o gene *BCL11A* (linfoma de células B/leucemia 11A), localizado no cromossomo 2p16, age naturalmente como um repressor da expressão de HbF, sendo capaz de alterar quantitativamente o nível de HbF em várias populações com ou sem β -hemoglobinopatia (CHEN *et al.*, 2009). Além disso, tem sido relatado que polimorfismos nesse gene podem levar ao aumento da expressão de HbF (LETTRE *et al.*, 2008).

De acordo com Lettre *et al.* (2008), a variação de HbF foi fortemente associada com o polimorfismo do gene *BCL11A*, principalmente nos SNPs rs4671393, rs11886868 e rs7557939. Os mesmos pesquisadores mostraram que a região rs4671393 representa o melhor sinal de associação entre os níveis HbF nas populações com doença falciforme.

1.8 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU), também conhecida como hidroxycarbamida, é um inibidor da ribonucleotídeo redutase e foi aprovada pelo FDA dos EUA em 1998 para o tratamento da AF. A HU apresenta múltiplos efeitos fisiológicos incluindo o aumento da expressão de HbF, diminuição da contagem de leucócitos e funcionando como doadora de NO (FERNANDES, 2017; KATO *et al.*, 2018).

A utilização dessa droga está associada a uma menor incidência de crises vasculares, hospitalizações e mortalidade na AF. Em contraste, alguns pacientes não apresentam uma boa resposta e as limitações de adesão ao tratamento ou a variabilidade genética (farmacogenômica) são fatores que podem estar envolvidos na resposta terapêutica (WALSH *et al.*, 2014; HUSAIN; HARTMAN; DESA, 2017).

Além da falta de uniformidade de resposta a HU entre os pacientes com AF, outro aspecto negativo em relação ao seu uso está associado a sua toxicidade. Tem sido mostrado que doses aumentadas da droga conferem um maior efeito terapêutico, no entanto também estão associadas a uma maior toxicidade. Por se tratar de um agente específico que age no ciclo celular seus efeitos adversos a longo prazo também tem sido especulados (FERNANDES, 2017).

1.9 Mecanismos de Reparo Dano de DNA

Diversos agentes etiológicos são capazes de causar danos ao DNA e, dentre eles, podemos destacar os agentes oxidantes, radiações ultravioletas e ionizantes e diversas substâncias químicas encontradas no meio ambiente (KAO *et al.*, 2005). A resposta ao dano de DNA (DDR) da célula está relacionada à sua capacidade de detectar e sinalizar problemas em seu DNA, tendo como objetivo ativar mecanismos apropriados de reparo, manter a progressão no ciclo celular ou eliminar células com genoma irreparável. Desta forma, a resposta ao dano no DNA desempenha um papel relevante em vários aspectos do câncer, podendo atuar como barreira na proliferação de células anormais e o desenvolvimento de tumores nos estágios iniciais (MARÉCHAL; ZOU, 2013; WEBER; RYAN, 2015).

A manutenção da integridade genômica proporciona a proteção contra o desenvolvimento do câncer, permitindo que a célula tenha capacidade de responder corretamente e reparar os danos ao DNA (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010).

O sistema de reparo do DNA é um dos processos mais relevantes para a manutenção da integridade dos organismos vivos e para garantir sua estabilidade genômica, sendo, conseqüentemente, essencial para manter a viabilidade e longevidade de um organismo (KIM *et al.*, 2001; HOEIJMAKERS, 2009; OZTURK; DEMIR, 2011).

As células têm inúmeras vias de reparo do DNA com o objetivo de preservar a estabilidade genômica quando os danos ocorrem (IYAMA; WILSON, 2013). O sistema de reparo do DNA está dividido em duas grandes vias e, dependendo de onde lesão ocorre, pode atuar em uma das fitas (danos de fita simples) ou em ambas as fitas (danos de fita dupla) do DNA. Caso o dano ocorra em somente uma fita do DNA, têm-se os mecanismos de reparo de erros de emparelhamento entre base (MMR), reparo por excisão de bases (BER) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (KAO *et al.*, 2005; IYAMA; WILSON, 2013). Caso as lesões acometam a dupla fita do DNA (DFD) têm-se os mecanismos de recombinação homóloga (HR) ou junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (BRENERMAN *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015).

O reparo por HR consiste no mecanismo de alta fidelidade e livre de erros, sendo caracterizado pela utilização de uma fita de DNA homólogo (cromátide irmã) como molde para guiar o reparo (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; IYAMA; WILSON, 2013). Destaca-se que este mecanismo de reparo pode atuar tanto na fase S quanto na fase G2 do ciclo celular, onde as cromátides irmãs estão intactas e disponíveis (BELLI *et al.*, 2002 WEST, 2003). A via de reparo por HR envolve o processamento das extremidades, formando uma região de fita

simples no DNA, seguido pela invasão da fita molde do DNA homólogo, formando uma estrutura conhecida como junção de Holliday (HABER *et al.*, 2004).

O reparo por NHJE é predominante na fase G1 do ciclo celular, pois nesta fase do ciclo um doador de homologia não está próximo. É caracterizado por agir na junção das pontas quebradas das fitas, sendo assim considerada uma via não livre de erro, por não utilizar uma fita como molde, sendo este processo geralmente associado ao acometimento de anormalidades cromossômicas (JEPPESEN *et al.*, 2011; BOULEY *et al.*, 2015). É um mecanismo molecular que depende da ligação das proteínas KU70 e KU80 às extremidades da quebra no local da lesão (LIEBER, 2008; CLARKE *et al.*, 2011; IYAMA; WILSON, 2013). Logo após, há o recrutamento de DNAPKcs (codificada pelo gene *XRCC7*), que sinaliza a presença da quebra e ativa as outras proteínas, tal como o complexo XRCC4-ligase IV, para, assim, dar continuidade à via de reparo por NHEJ (LIEBER, 2008; CLARKE *et al.*, 2011).

Os DFD (dano de fita dupla) são os mais deletérios tipos de danos ao DNA, e se não reparados, podem levar à quadros de instabilidade genômica, aberração cromossômica e translocação. As células que sobrevivem após o reparo inadequado podem tornar-se malignas. Desde modo, a resposta celular a um DSB exige que o sinal de dano no DNA seja transmitido com rapidez e precisão para inúmeros processos em toda a célula. Nessas situações, vias de DDR são ativadas por quinases como a ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a ataxia telangiectasia Rad3-relacionada (ATR) as quais podem atuar como sensores e/ou iniciadores de mecanismos de resposta ao estresse genotóxico (BOHGAKI; BOHGAKI; HAKEM, 2010; IYAMA; WILSON, 2013; MORIO, 2017).

1.10 Genes Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) e Ataxia Telangiectasia Rad3-relacionada (ATR)

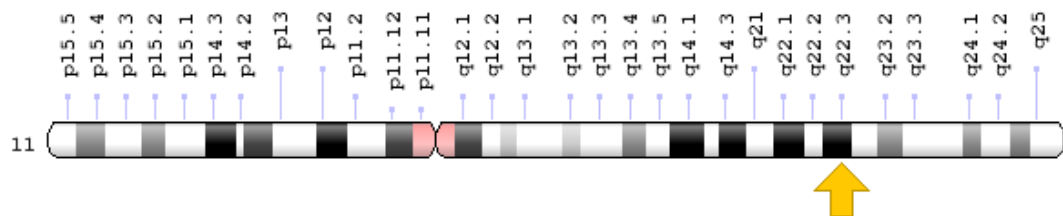
O bloqueio do ciclo celular é uma importante resposta observada em decorrência ao dano no DNA, interferências nesse mecanismo podem resultar no acúmulo de alterações genéticas e/ou proliferação celular descontrolada, levando à instabilidade genômica e ao desenvolvimento neoplásico. É importante ressaltar que a resposta ao DFDs no DNA exige que haja uma sinalização desse dano, e esta deve ser transmitida com rapidez e precisão para os inúmeros processos em toda a célula (IYAMA; WILSON, 2013). Bensimon e colaboradores (2011) sugere que os membros da superfamília de proteínas fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) são ativadas muito cedo em resposta a lesões no DNA, podendo, assim, funcionar como iniciadores dos mecanismos de resposta ao dano.

A família PI3K, em humanos, inclui as proteínas ATM, ATR, ATX/SMG-1, mTOR/FRAP e proteína quinase dependente DNA (DNAPK) (BAO *et al.*, 2001; LEMPIÄINEN; HALAZONETIS, 2009; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011).

O mecanismo de transdução de sinal que dissemina o alarme de dano ao DNA inicia-se com proteínas de sensoriamento que detectam o dano ou a alteração da cromatina e mediam a ativação de transdutores, que por sua vez transmitem o alarme para numerosas proteínas efetores participantes dos distintos mecanismos de reparo do DNA inerentes ao maquinário celular (BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011) Sabe-se que ATM e ATR estão presentes em amplos processos celulares que são importantes para a manutenção da estabilidade genômica dos organismos e podem atuar em conjunto ou separadamente (MARÉCHAL; ZOU, 2013).

O *ATM* é um gene supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 11 na posição 11q22.3-23.1 que, quando ativado, leva a síntese da proteína ATM em seres humanos (URESHINO *et al.*, 2016). O gene *ATR* está localizado no braço longo do cromossomo 3 na posição 3q23 (ANDEGEKO *et al.*, 2001).

Figura 3 – Representação esquemática da localização do gene *ATM* no cromossomo 11



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATM#location>

O gene *ATM* é o responsável por ativar a via de resposta ao dano do ciclo celular mediante fosforilação da proteína p53 (SHIEH *et al.*, 1997; SILICIANO *et al.*, 1997). Neste contexto, o transdutor primário do alarme do DFDs é o ATM, o qual atua como uma proteína quinase de fosforilação de serina-treonina. O *ATM* e o *ATR* podem ser ativados por danos no DNA, porém é desconhecido o mecanismo exato de como essas duas quinases reconhecem o dano. O *ATM* responde principalmente a quebras fita duplas induzidas por radiações ionizantes e EROs (ALEXANDER; WALKER, 2010; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011), ao passo que *ATR* responde às lesões induzidas pelos raios UV ou a agentes que causam bloqueio na forquilha de duplicação e também no controle da apoptose (ANDEGEKO *et al.*, 2001; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011)

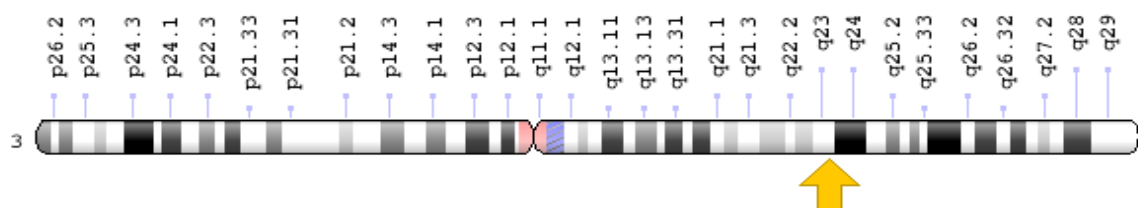
O *ATM* exerce um papel central no DDR por fosforilação de várias moléculas envolvidas no DDR, e está relacionado não só no reparo de DSB, mas também, com a regulação do ciclo celular, regulação transcricional e manutenção de telômeros (MORIO, 2017). É responsável por modificar diversas proteínas fosforilantes diretamente envolvidas no processo de reparo e, como também, modifica diversos componentes principais da estrutura da cromatina. A modulação da cromatina dependente de *ATM* permite o acesso ao maquinário de reparo e restabelecer os domínios de cromossomos inteiros (CLOUAIRE; MARNEF; LEGUBE, 2017).

Na ocorrência das DFDs, a proteína ATM atua na ação inicial e rápida ao dano no DNA, levando a modificações em diversas vias celulares. Uma dessas modificações é a ativação da proteína p53 que se concentra e leva à ativação do gene que codifica a proteína p21 que é inibidora do maquinário celular. Outra via de atuação do ATM é a ativação da proteína Chk2, que é responsável pela fosforilação e inativação de Cdc25c, mantendo a continuidade da fase G2 do ciclo celular. Quando ocorre a desfosforilação da Cdc25c ocorre a ativação de quinase dependente de ciclina Cdc2, promovendo a parada do ciclo celular. O ATM também pode atuar na fosforilação da proteína Mdm2 que é responsável pela exportação nuclear de p53 impedindo, assim, a degradação de p53 (ANDEGEKO *et al.*, 2001).

Ao mesmo tempo em que o gene *ATM* atua, principalmente, em resposta aos DBSs, o gene *ATR* é ativado devido a uma série de lesões prejudiciais ao DNA que envolvem junções de cadeia simples, como as geradas quando a forquilha de replicação encontra uma lesão do DNA ou durante o reparo de excisão de nucleotídeos, atuando, também, sendo também ativado pela ressecção de uma dupla fita de DNA e na resposta aos danos por radiação UV (ANDEGEKO *et al.*, 2001; CLOUAIRE; MARNEF; LEGUBE, 2017).

O gene *ATR* está localizado no braço longo do cromossomo 3 na posição 3q23 (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática da localização do gene *ATR* no cromossomo 3



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ATR#conditions>

A proteína ATR, pode levar à ativação da proteína quinase Chk1 que atua de forma similar à proteína Chk2, ativada pelo ATM, inativando Cdc25c, em resposta aos danos citados anteriormente (ANDEGEKO *et al.*, 2001)

O ATM está relacionado também a resposta ao estresse oxidativo, tendo sido demonstrado que os alvos do ATM/ATR são fosforilados pelo ATR e pelo ATM em consequência à hipóxia e à re-oxigenação, respectivamente (WATTERS, 2003; BENSIMON; AEBERSOLD; SHILOH, 2011). A ativação de ATM pode conduzir as células a um bloqueio do ciclo celular, que pode ocorrer nas fases G1, S ou G2. A hipóxia pode alterar os pontos de checagem do ciclo celular e os pontos de detecção e de reparo do dano no DNA, levando a ativar as proteínas de verificação ATM e ATR.

A hipóxia pode induzir uma parada do ciclo celular na fase G1 e/ou parada na fase S (replicação do DNA). A parada de fase G2 pode ocorrer após a re-oxigenação. Esses *checkpoints* são controlados pelo WAF1–Ciclina E–CDK2 (quinase dependente de ciclina 2), ATM-p53–CHK2, vias ATR–CHK1 e pela fosforilação de BRCA1. Muitos fatores podem alterar o reparo geral do DNA em células sob condições hipóxicas, incluindo alterações na expressão gênica. A re-oxigenação produz ROS, que gera dano ao DNA (DNA SSBs e possivelmente DNA DSBs) e isso inicia um ponto de verificação na fase G2 do ciclo celular dependente de CHK2. Em contraste, a hipóxia crônica pode levar à adaptação e não ativar os pontos de verificação G1 ou S, isso poderia levar ao acúmulo de erros de replicação ou quebras de DNA ao longo do tempo (GLAZER *et al.*, 2013).

1.11 Polimorfismo dos genes *ATM* e *ATR*

A descrição uniforme de sequências variantes de DNA e proteínas humanas (mutações ou polimorfismos) foi publicado por Beaudet *et al.*, (1993). Nesse cenário, qualquer alteração rara na sequência de nucleotídeos geralmente causando uma doença, é denominado mutação. Esta mudança na sequência nucleotídica pode ou não causar alteração no fenótipo. Mutações podem ser herdadas dos pais (mutações germinativas) ou adquiridas ao longo da vida de um indivíduo (mutações somáticas), sendo esta última a principal condutora de doenças humanas como o câncer. As mutações geralmente surgem de danos de DNA não reparadas, erros de replicação ou elementos genéticos móveis (transpososomas) (KARKI *et al.*, 2015). Existem várias classes principais de mutações no DNA. Uma mutação pontual, por exemplo, ocorre quando um único nucleotídeo é adicionado, excluído ou substituído, essas mutações são denominadas de SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) (KASSAM *et al.*, 2005).

Uma variação na sequência de DNA que ocorre em uma população com uma frequência de 1% ou superior é denominada polimorfismo (BROOKES, 1999). A maior incidência na população sugere que o polimorfismo é natural, com um efeito neutro ou benéfico. O SNP exemplifica o polimorfismo mais comum, e surge a cada 1.000 pares de base no genoma humano. É geralmente encontrado em áreas flanqueando genes codificadores de proteínas - regiões agora reconhecidas como fundamentais para a ligação de microRNA e regulação de expressão gênica/proteica. No entanto, os SNPs também podem ocorrer em sequências de codificação, introns ou em regiões intergênicas. Os SNPs são usados como assinaturas genéticas em populações para estudar a predisposição para certas características, incluindo doenças (COLLINS, A; LONJOU, C; MORTON, N. E., 1999; HUGHES *et al.*, 2008; TAWIFIK; SPRUIT *et al.*, 2018).

Mutações que afetam a função das enzimas de reparo de DNA são raras em população humanas porque estas podem causar sérias consequências para a saúde. Diversas variações em sequências de genes de DNA de reparo tem sido descritas (ROBERTSON; K.D.; WOLFFE, A.P., 2000). O reparo do DNA é um exemplo de um processo celular no qual a variação genética em famílias com predisposição extrema tem sido relatada e está associada à alta probabilidade de desenvolver doenças, incluindo a síndromes de envelhecimento prematuro e o câncer. Há evidências crescentes que apontam que existem reduções moderadas na capacidade de reparo do DNA e estas estão associadas a variações genéticas comuns (polimorfismos). A extensa variação encontrada nas regiões codificadoras dos genes de reparo do DNA e o grande número de genes em cada uma das principais vias de reparo resulta em genótipos complexos com potencial para impactar o risco de complicações diversas doenças na população em geral. Associações significativas com câncer de pulmão, câncer de cabeça e pescoço e câncer de bexiga foram relatados (BUTKIEWICZ *et al.*, 2001; SPITZ *et al.*, 2001; STERN *et al.*, 2002; STURGIS *et al.*, 2002; TOMESCU *et al.*, 2001).

O polimorfismo rs228593 na região intrônica do gene *ATM*. Está localizado no braço longo do cromossomo 11 na posição 11q22-q23. O gene *ATR* está localizado no braço longo do cromossomo 3, região 23 (NCBI dbSNP 2018). O polimorfismo rs2229032 está localizado na região codificadora do gene e a troca de CGA \Rightarrow CAA reflete na troca de R [Arg] \Rightarrow Q [Gln] (NCBI dbSNP 2018). Polimorfismos funcionais do gene *ATM* e *ATR* têm sido associados com o aumento do risco de desenvolvimento de Leucemia Mielóide Crônica (LMC), bem como a sua progressão (GORRE *et al.*, 2016), cancer oral (BAU *et al.*, 2010), cancer de pulmão (LO *et al.*, 2010), cancer de mama (LEE *et al.*, 2005), dentre outros.

Sabe-se que a fisiopatologia da AF é caracterizada por um processo inflamatório, pelo estresse oxidativo e pelo *turnover* aumentado de células na medula óssea, os quais, juntamente com a hipóxia, têm sido associados à instabilidade genética e funcionam como um fator de risco para o desenvolvimento de alterações genéticas. Essa instabilidade pode surgir a partir de uma resistência a apoptose mediada por hipóxia e/ou através do comprometimento dos mecanismos de reparo do DNA, levando ao aumento das taxas de mutagênese. Tendo em vista, que até o presente momento não existem relatos na literatura sobre estudos que avaliem o papel dos polimorfismos dos genes *ATM* e *ATR* em paciente com AF, tão pouco sua correlação com as complicações dessa doença e com os polimorfismos do gene *BCL11A*, buscamos avaliar o a contribuição desses polimorfismos sobre as várias manifestações da AF.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Identificar os polimorfismos do gene *BCL11A* e dos genes de reparo de fita dupla do DNA, *ATM* e *ATR*, nos pacientes com Anemia Falciforme.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e analisar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com anemia falciforme com e sem uso de hidroxiuréia;
- Identificar os polimorfismos do gene *BCL11A* nas regiões rs7557939, rs4671393 e rs1186868 nos pacientes com AF;
- Identificar os polimorfismos do gene *ATM* na região rs228593 e do *ATR* na região rs2229032 nos pacientes com AF;
- Associar os polimorfismos do gene *BCL11A* e dos genes de reparo *ATM*, *ATR* com os achados clínicos e laboratoriais dos pacientes com AF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, analítico e observacional de pacientes diagnosticados com Anemia Falciforme.

3.2 Local da pesquisa

A coleta das amostras de sangue periférico dos pacientes portadores de AF (HbSS) foi realizada no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) e em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), ambos pertencente ao Departamento de Análises Toxicológicas (DACT) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.3 População do estudo

Participaram do estudo 125 pacientes com diagnóstico clínico de AF acompanhados no HUWC, no período de julho de 2016 a outubro de 2018. Desse total, 98 pacientes apresentavam a informação quanto ao uso de HU. Essa amostragem correspondeu a aproximadamente 70% dos pacientes com cadastro ativo na referida instituição.

Grupo estudo:

- Grupo SS – pacientes não tratados com HU (n=23);
- Grupo SSHU – pacientes tratados com HU (n=75) na dose de 20-30mg/kg/dia.

3.3.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com diagnóstico clínico e molecular de Anemia Falciforme e em estado estacionário de acordo com os critérios de Ballas, 2011;

Critérios de Ballas: 1) Ausência de úlcera de perna, crises vaso-oclusivas e quadro infeccioso nas últimas quatro semanas precedentes ao estudo, 2) ausência de admissão hospitalar nos últimos 2-3 dias precedentes ao estudo e 3) ausência de transfusão sanguínea nos últimos três meses precedentes ao estudo.

3.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes em período gestacional;
- Pacientes politransfundidos;
- Outras doenças hematológicas.

3.4 Coleta de dados

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com AF foram obtidos a partir dos prontuários médicos e de informações no ambulatório do HUWC.

3.5 Coleta de amostras

As amostras de sangue periférico dos pacientes portadores de AF foram coletadas em tubos *Vacutainer*[®] contendo EDTA como anticoagulante. Estas foram utilizadas na obtenção do *pool* celular para a extração do material genético (DNA) e posterior realização dos polimorfismos dos genes *BCL11A*, *ATM* e *ATR*.

3.6 Análises moleculares

3.6.1 Processo de lise dos leucócitos

Após a coleta de sangue periférico dos pacientes e controles, foi realizada a centrifugação das amostras contendo EDTA a uma rotação de 4000 g durante 10 minutos para resgatar o *pellet* leucocitário. Em seguida, o *pellet* foi transferido para um tubo do tipo *Falcon* de 50 mL e lavado com solução de lise (25 mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi homogeneizado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a uma rotação de 4000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida, foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS e 750 uL de *Trizol LS Reagent*[®] (*Invitrogen*, EUA). Posteriormente, o material foi homogeneizando com pipeta até total dissolução. Após este procedimento, essa amostra lisada e armazenada no freezer a -80°C.

3.6.2 Extração de DNA das amostras de sangue periférico

Para a obtenção do DNA, inicialmente foi removido o sobrenadante da fase clorofórmio-fenol que contém RNA. Em seguida, a fase orgânica resultante foi reservada para a realização da extração de DNA. A esta fase orgânica foi adicionada 500 µL de BEB (*Back Extraction Buffer*) sendo, em seguida, homogeneizado por 1 minuto, incubado por 30 minutos sob agitação constante e, posteriormente, centrifugado por 1200 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo e o precipitado resultante dessa fase foi estocado a -80°C para posterior extração de proteínas. No tubo com

sobrenadante, foram adicionados 400 µL de isopropanol para a precipitação do DNA. As amostras foram, então, homogêneas por inversão e incubadas durante 1 hora a -20°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado a uma rotação de 14000 rpm durante 5 minutos à 4°C, esse procedimento foi repetido 4 vezes. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e tubo contendo o DNA permaneceu secando a temperatura ambiente. O DNA foi hidratado com água livre de DNase e permaneceu em banho-maria durante 30 minutos à 60°C. Em seguida, as amostras foram quantificadas e estocadas à -20°C.

3.6.3 Quantificação do DNA

O DNA extraído das amostras foi quantificado por nanoespectrofotometria em *Nanodrop (ThermoScientific®)* no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40µg/ml para 1 unidade de absorvância. Este aparelho quantifica ácidos nucleicos e proteínas, através da leitura de comprimento de onda absorvido ou refletido. A absorvância de 260 nm indica o pico de absorção de UV do DNA, a absorvância de 280 nm o pico de absorção de UV de proteínas e 230 nm o pico de absorção de UV para contaminantes orgânicos. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280 e 260/230, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 2,1.

3.6.4 Análise dos polimorfismos dos genes *BCL11A*, *ATM* e *ATR*

Para a análise dos polimorfismos, foi utilizado o ensaio de discriminação alélica para genotipagem dos genes *BCL11A*, *ATM* e *ATR* com o uso de oligonucleotídeos e sondas *Taqman® AssayProbes (AppliedBiosystems®, California, USA)*, através do equipamento de (qPCR) no aparelho *CFX96 Real-time System (Bio-RadLaboratories®, Inc., Hercules, California, USA)* disponível no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT). As reações foram preparadas utilizando-se o *TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Inc., Foster City, CA, USA)* otimizado para reações com sonda *TaqManassay®* e contendo a *AmpliTaq Gold DNA* polimerase, dNTPs e tampão otimizado.

Para realização do ensaio de discriminação alélica dos polimorfismos, as amostras de DNA extraídas foram diluídas até 30 ng, após quantificação estimada através de leitura espectrofotométrica pelo equipamento *Nanodrop (Thermo Fisher Scientific® Inc., Shanghai, China)*. As designações dos genes e seus polimorfismos e as sondas utilizadas estão descritas na Tabela 1. Após o fim das reações, o programa *Bio-Rad CFX Manager 3.1 (3.1.1517.0823)*

System Software plotou os resultados da discriminação alélica em gráficos que ilustram a emissão de fluorescência em cada amostra submetida à amplificação.

Tabela 1 – Genes e polimorfismos dos genes estudados e sonda *Taqman*®.

Gene	Localização do gene	SNP	Localização do polimorfismo	Nucleotídeo mudança
<i>ATM</i>	11q22.3	rs1762265	Íntron	G → A
<i>ATR</i>	3q23	rs2229032	Íntron	C → T
<i>BCL11A</i>	2p16.1	rs1186868	Intron	C → T
		rs4671393	Intron	A → G
		rs7557939	Intron	G → A

Fonte: RefSNP, 2018

3.7 Análise Estatística

As diferenças entre as distribuições alélicas e genotípicas, os modelos genéticos e a análise do Equilíbrio de *Hardy-Weiberg* ($p > 0,05$) foram analisadas com o teste de qui-quadrado (com um grau de liberdade) ou teste exato de *Fisher* (CLARKE *et al.*, 2011). O teorema de *Hardy-Weinberg* consiste na base teórica da genética das populações, avaliando a o princípio do equilíbrio gênico no processo evolutivo, consistindo em uma importante análise na verificação da população proposta nos estudos de polimorfismos.

Tabela 2 – Lista de testes estatísticos de associação realizados para cada polimorfismo e variável.

Distribuição Genotípica	SELVAGEM versus HETEROZIGOTO versus MUTANTE
Modelo Genético de Dominância	SELVAGEM versus MUTANTE + HETEROZIGOTO
Modelo Genético de Recessividade	MUTANTE versus SELVAGEM + HETEROZIGOTO
Modelo Genético de Homozigose	HOMOZIGOTO SELVAGEM versus HOMOZIGOTO MUTANTE
Modelo Genético de Heterozigose Dominante	HOMOZIGOTO SELVAGEM versus HETEROZIGOTO
Modelo Genético de Heterozigose Recessiva	HOMOZIGOTO MUTANTE versus HETEROZIGOTO

Fonte: Adaptado de Clarke *et al.*, (2011).

A análise de regressão logística foi utilizada para estimar a razão de chances (*odds ratio*) para as variáveis associadas a um quadro clínico mais grave na AF. O nível de significância estatística utilizado foi $p < 0,05$ (*2-sided*) e todas as análises foram efetuadas com recurso ao *software SPSS* na versão 20.0 (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, USA).

3.8 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HUWC e HEMOCE, pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS do Ministério da Saúde, (Nº dos processos: 1.228.634 e 2.979.265), respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Análises dos dados demográficos, clínicos e laboratoriais

Do total de 98 pacientes com AF, a média de idade foi de 33 anos, variando de 18 – 65 anos, sendo a maioria (58%) do sexo feminino. As características sociodemográficas (sexo e idade), clínicas e laboratoriais dos pacientes com AF estão descritas nas Tabela 3 e 4.

Tabela 3 – Características sociodemográficas e laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros sociodemográficos, clínicos e laboratoriais	Média e amplitude ou Número absoluto e percentual (%)	
Idade (anos)	33	18 – 65
Sexo		
Masculino	41	42
Feminino	57	58
Peso (kg)	55,7	34,4 – 87,0
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,3	1,3 – 3,8
Hemoglobina (g/dL)	9,0	5,4 – 12,3
Hematócrito (%)	26,2	15,1 – 38,5
VCM (fL)	106,1	75,1 – 137,3
HCM (pg)	36,8	24,1 – 48,6
CHCM (g/dL)	34,8	30,5 – 52,9
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	9451,4	4449,0 – 17400,0
Neutrófilos ($/\text{mm}^3$)	4705,2	1279,0 – 9554,0
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	353,2	106,0 – 738,0
Hemoglobina A₂ (%)	3,1	2,3 – 3,6
Hemoglobina F (%)	13,8	1,8 – 32,2
Hemoglobina S (%)	82,2	63,5 – 96,6
Hidroxiuréia		
Não	23	23,5
Sim	75	76,5

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Dos pacientes avaliados, 76,5% estavam em uso de hidroxiuréia no momento do estudo, realizamos a avaliação da influência do tratamento sobre os parâmetros clínicos (TABELA 4).

Foi observada uma associação entre a úlcera de membros inferiores (MMI) e o tratamento com hidroxiuréia, mostrando que o tratamento está associado com menos eventos ulcerativos nos MMI. Os demais parâmetros clínicos não demonstraram associação com a intervenção terapêutica (uso de HU) e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Relação entre o tratamento com hidroxiuréia e os parâmetros clínicos analisados.

Parâmetros Clínicas	Número (%)		p Valor	Características Clínicas	Número (%)		p Valor
	Sem HU	Com HU			Sem HU	Com HU	
Crise Álgica			0,623	Hemossiderose			>0,999
Ausência	2 (2)	4 (4,1)		Ausência	11 (23)	29 (60,5)	
Presença	21 (21,4)	71 (72,5)		Presença	2 (4)	6 (12,5)	
Úlcera de MMI			0,038	STA			0,113
Ausência	19 (20)	45 (47,3)		Ausência	22 (23)	65 (67,7)	
Presença	3 (3,2)	28 (29,5)		Presença	0 (0,0)	9 (9,4)	
Litíase			0,107	Dispneia			0,633
Ausência	10 (20,9)	17 (35,4)		Ausência	7 (14,6)	33 (68,7)	
Presença	3 (6,2)	18 (37,5)		Presença	2 (4,2)	6 (12,5)	
Trombose			0,473	Convulsão			>0,999
Ausência	12 (25)	34 (70,8)		Ausência	9 (18,7)	36 (75,0)	
Presença	1 (2,1)	1 (2,1)		Presença	0 (0,0)	3 (6,3)	
Necrose óssea			0,195	Colelitíase			>0,999
Ausência	19 (20)	70 (73,0)		Ausência	6 (12,5)	24 (50,0)	
Presença	3 (3,0)	4 (4,0)		Presença	3 (6,3)	15 (31,2)	
Priapismo			0,618	Astenia			0,480
Ausência	20 (21,0)	70 (73,0)		Ausência	8 (17,0)	36 (76,6)	
Presença	2 (2,0)	4 (4,0)		Presença	1 (2,1)	2 (4,3)	
AVC			0,679				
Ausência	21 (22,0)	66 (68,7)					
Presença	1 (1,0)	8 (8,3)					

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Hidroxiuréia (HU); Membros inferiores (MMI), Acidente Vascular Cerebral (AVC); Síndrome torácica aguda (STA).

Nos pacientes em uso de HU, o VCM e o HCM foram maiores do que nos pacientes sem uso de HU ($p < 0,001$). A leucometria dos pacientes em tratamento foi inferior quando comparados com os pacientes não tratados ($p = 0,029$). Da mesma forma, o número absoluto de neutrófilos foi inferior em pacientes que faziam uso de HU ($p = 0,047$) (TABELA 5). Para os outros parâmetros avaliados, não houve diferença estatística entre pacientes que usavam ou não a HU.

Tabela 5 – Relação entre a hidroxiuréia e os parâmetros laboratoriais (n=98).

Parâmetros Laboratoriais	Média (Mínimo – Máximo)		p Valor
	Sem HU	Com HU	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,6 (1,4 – 3,8)	2,3 (1,3 – 3,3)	0,078
Hemoglobina (g/dL)	8,9 (5,4 – 12,3)	9,1 (5,4 – 11,6)	0,601
Hematócrito (%)	26,4 (15,6 – 38,5)	26,1 (15,1 – 34,8)	0,784
VCM (fL)	93,4 (75,1 – 123,6)	109,8 (78,5 – 137,3)	<0,001

HCM (pg)	31,6 (24,1 – 41,4)	38,3 (27,5 – 48,6)	<0,001
CHCM (g/dL)	34,5 (30,5 – 52,9)	34,9 (31,4 – 38,6)	0,729
Leucócitos (10³/mm³)	10,7 (4,8 – 17,2)	9,1 (4,4 – 17,4)	0,029
Neutrófilos (10³/mm³)	5,7 (4,0 – 7,4)	4,5 (1,2 – 9,5)	0,047
Plaquetas (10³/mm³)	357,5 (111,0 – 738,0)	355,5 (106,0 – 685,3)	0,958
Hemoglobina A₂ (%)	2,9 (2,5 – 3,4)	3,2 (2,3 – 3,6)	0,147
Hemoglobina F (%)	13,1 (3,1 – 27,9)	14,0 (1,8 – 32,2)	0,666
Hemoglobina S (%)	79,8 (65,4 – 93,4)	80,3 (63,5 – 96,0)	0,853

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Hidroxiuréia (HU); Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

4.2 Análises do Polimorfismo do gene *BCL11A*

4.2.1 Influência do polimorfismo do gene *BCL11A* na região rs7557939 sobre os parâmetros laboratoriais e clínicos.

Na avaliação genotípica das diferentes regiões estudadas do gene *BCL11A*, as maiores frequências foram: 40,7% para o genótipo heterozigoto na região rs7557939, 38,9% para o genótipo heterozigoto na região rs1186868 e 47,3% para o genótipo homozigoto selvagem na região rs4671393 (TABELA 6).

Tabela 6 – Frequência genotípica do gene *BCL11A* em pacientes com Anemia Falciforme

Polimorfismo do gene <i>BCL11A</i>	Número absoluto e percentual (%)	
	n	%
BCL11A rs7557939		
Genótipo A/A	16	27,1
Genótipo A/G	24	40,7
Genótipo G/G	19	32,2
BCL11A rs1186868		
Genótipo C/C	21	38,9
Genótipo C/T	21	38,9
Genótipo T/T	12	22,2
BCL11A 4671393		
Genótipo C/C	26	47,3
Genótipo C/T	21	38,2
Genótipo T/T	8	14,5

A estratificação dos dados laboratoriais quanto ao polimorfismo do gene *BCL11A* na região rs7557939 revelou uma relação entre os diferentes genótipos e os níveis de HbF ($p=0,0038$), VCM ($p<0,001$) e HCM ($p=0,030$). Estes e os demais dados clínicos estão descritos na Tabela 7.

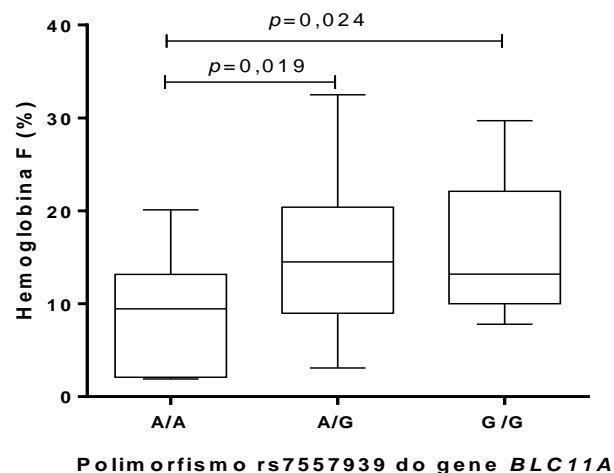
Tabela 7 – Relação entre o polimorfismo rs7557939 do gene *BCL11A* e os parâmetros hematológicos e laboratoriais nos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Laboratoriais	Média (Mínimo – Máximo)			p Valor
	A/A	A/G	G/G	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,1 (2,1 – 2,1)	2,5 (1,8 – 3,1)	2,2 (1,8 – 2,7)	0,643
Hemoglobina (g/dL)	9,22 (7,1 – 12,3)	9,15 (5,4 – 11,1)	8,61 (5,37 – 11,10)	0,367
Hematócrito (%)	26,9 (20,7 – 38,5)	26,8 (15,6 – 33,8)	24,8 (15,1 – 31,8)	0,287
VCM (fL)	90,4 (75,1 – 105,8)	105,4 (87,6 – 125,8)	106,3 (81,6 – 137,3)	<0,001
HCM (pg)	32,2 (24,7 – 47,1)	35,9 (24,1 – 44,7)	37,1 (24,9 – 48,6)	0,030
CHCM (g/dL)	34,5 (31,7 – 37,5)	35,1 (31,4 – 52,9)	34,7 (30,5 – 37,8)	0,841
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	10,2 (4,8 – 15,8)	8,9 (5,1 – 15,1)	10,1 (5,1 – 17,4)	0,377
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	1,3 (1,3 – 1,3)	3,9 (3,5 – 4,3)	4757,2 (1,2 – 7,4)	0,585
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	358,7 (111,0 – 597,0)	366,7 (123,6 – 738,0)	371,3 (106,0 – 685,3)	0,965
Hemoglobina A ₂ (%)	3,3 (3,3 – 3,3)	2,9 (2,9 – 3,0)	3,0 (2,5 – 3,6)	0,285
Hemoglobina F (%)	9,7 (1,9 – 23,3)	15,5 (3,1 – 32,2)	15,5 (7,8 – 29,7)	0,038
Hemoglobina S (%)	84,3 (66,6 – 96,0)	79,3 (63,5 – 93,4)	79,0 (65,5 – 90,6)	0,123

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

A HbF foi menor em pacientes com o genótipo homocigoto selvagem (A/A) quando comparado aos pacientes heterocigotos (A/G) ($p=0,019$) e homocigotos mutantes (G/G) ($p=0,024$) (TABELA 7, FIGURA 5).

Figura 5 – Associação do polimorfismo do gene *BCL11A* na região rs7557939 com o nível de HbF.

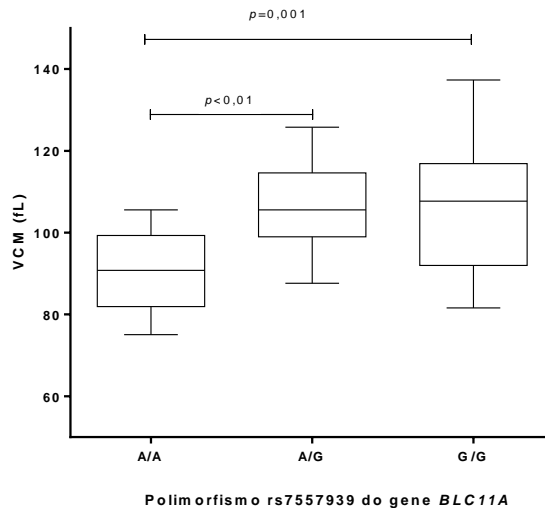


Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Nota: ANOVA $p=0,038$.

Para avaliar o efeito do polimorfismo sobre o nível de HbF, realizamos uma análise de regressão linear utilizando como covariável o uso de HU. A análise de covariância revelou que existe influência do polimorfismo do SNP rs7557939 do gene *BCL11A* sobre a concentração de HbF ($p=0,015$) independentemente do tratamento com HU ($p=0,264$).

A análise do SNP rs7557939, demonstrou que o genótipo homozigoto selvagem (A/A) está associado a um menor VCM quando comparado aos indivíduos A/G ($p=0,01$) e G/G ($p=0,001$) (TABELA 7, FIGURA 6).

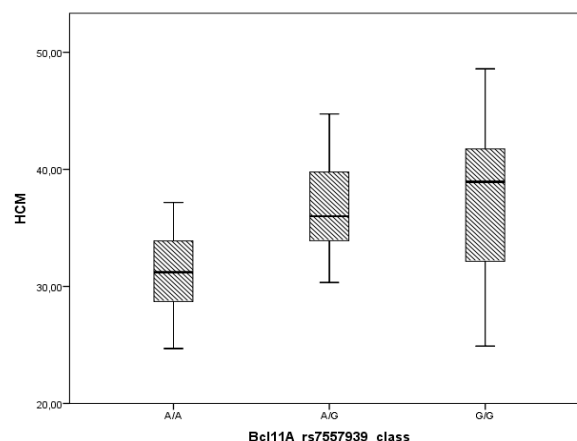
Figura 6 – Associação do polimorfismo do gene *BLC11A* na região rs7557939 com VCM.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. ANOVA $p < 0,001$.

A análise de covariância revelou que o VCM dos pacientes com AF é influenciado pela região polimórfica rs7557939 ($p < 0,001$) em associação com uso de HU ($p < 0,001$) (TABELA 7, FIGURA 7).

Figura 7 – Distribuição genotípica rs7557939 de acordo HCM.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Nota: ANOVA $p < 0,05$ e pós-teste $p < 0,05$.

O SNP rs7557939 também foi associado ao HCM ($p=0,002$). De acordo com a distribuição genotípica, pacientes com AF que apresentavam o alelo mutante heterozigotos ($p=0,006$) e homozigotos mutantes ($p=0,003$) apresentavam maior HCM do que aqueles com genótipo homozigoto selvagem A/A. A análise de covariância revelou que a associação

polimorfismo rs7557939 ($p=0,001$) sobre o HCM dos pacientes com AF é influenciado pela ação do tratamento com HU ($p<0,001$).

Na análise univariada para o rs7557939, foi identificada uma associação entre esse SNP e os pacientes que apresentavam úlcera de MMI ($p=0,037$) (TABELA 8). As demais variáveis não apresentaram diferenças estatísticas.

Tabela 8 – Relação entre o polimorfismo rs7557939 do gene *BCL11A* e os parâmetros clínicos dos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Clínicos	Número absoluto (%)			p valor
	A/A	A/G	G/G	
Crise Alérgica				0,222
Ausência	2 (11,8)	4 (14,8)	0 (0,0)	
Presença	15 (88,2)	23 (85,2)	20 (100,0)	
Úlcera de MMI				0,037
Ausência	10 (58,8)	11 (45,8)	16 (84,2)	
Presença	7 (41,2)	13 (54,2)	3 (15,8)	
Litíase				0,513
Ausência	9 (60,0)	9 (47,4)	10 (66,7)	
Presença	6 (40,0)	10 (52,6)	5 (33,3)	
Trombose				>0,999
Ausência	14 (93,3)	18 (94,7)	15 (100,0)	
Presença	1 (6,7)	1 (5,3)	0 (0,0)	
Necrose Óssea				>0,999
Ausência	16 (94,1)	23 (92,0)	18 (90,0)	
Presença	1 (5,9)	2 (8,0)	2 (10,0)	
Priaprismo				0,651
Ausência	16 (94,1)	23 (92,0)	17 (85,0)	
Presença	1 (5,9)	2 (8,0)	3 (15,0)	
AVC				0,879
Ausência	15 (88,2)	23 (92,0)	17 (85,0)	
Presença	2 (11,8)	2 (8,0)	3 (15,0)	
Hemossiderose				0,226
Ausência	12 (80,0)	18 (94,7)	11 (73,3)	
Presença	3 (20,0)	1 (5,3)	4 (26,7)	
STA				0,262
Ausência	17 (100,0)	21 (84,0)	18 (90,0)	
Presença	0 (0,0)	4 (16,0)	2 (10,0)	
Convulsão				0,538
Ausência	2 (100)	6 (100,0)	4 (80,0)	
Presença	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	
Colelitíase				0,592
Ausência	0 (0,0)	3 (50,0)	3 (60,0)	
Presença	2 (100,0)	3 (50,0)	2 (40,0)	
Astenia				0,167
Ausência	1 (50,0)	6 (100,0)	4 (100,0)	
Presença	1 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: MMI=Membros inferiores, AVC= AVC = Acidente Vascular Cerebral; STA=Síndrome torácica aguda.

Após realização da regressão nominal multivariada, encontramos que pacientes com o genótipo heterozigoto A/G apresentavam menor chance de ter úlceras do que os pacientes com os genótipos homozigotos selvagem e mutante. Além disso, a análise multivariada, revelou que o genótipo A/A se correlaciona com o aumento da chance de os pacientes com AF terem crises álgicas ($p < 0,001$) (TABELA 9).

Tabela 9 – Regressão logística multinominal para associar as ocorrências de crises álgicas ao SNP rs7557939

Variável	Genótipo	Wald	p valor	Exp (B)	IC 95% para Exp (B)	
					Mínimo	Máximo
Crises álgicas	A/A	394,1	<0,001	990110,4	160785,3	609709,0
	A/G	0,75	0,0142	0,16	0,0364	0,69

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: A/A: homozigoto selvagem, AG: heterozigoto, G/G homozigoto mutante. Valor estatisticamente significante para $p \leq 0,05$.

4.2.2 Influência do polimorfismo do gene *BCL11A* na região rs4671393 sobre os parâmetros laboratoriais e clínicos.

Na análise do polimorfismo rs4671393 verificou-se a diferença entre o número de leucócitos ($p=0,024$) e plaquetas ($p=0,027$) entre as distribuições genotípicas do gene *BCL11A* para esse SNP (TABELA 10).

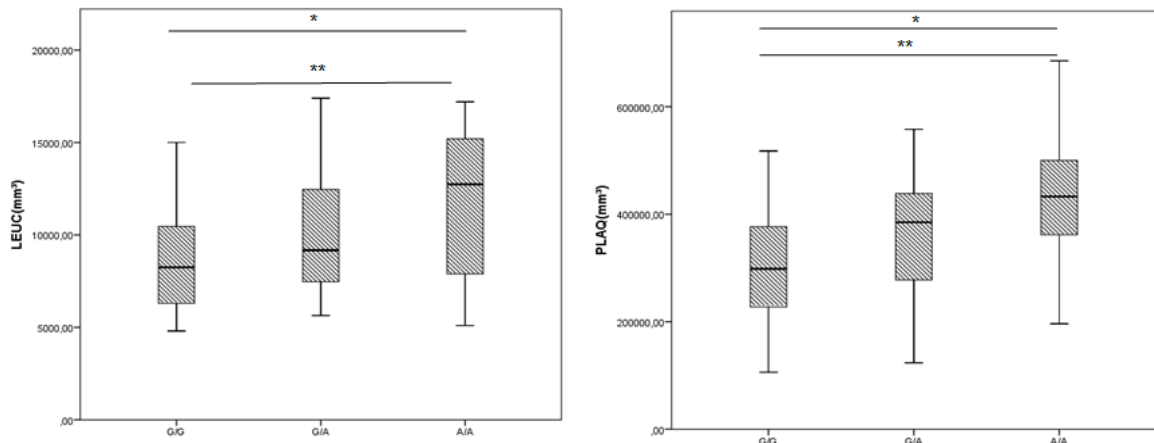
Tabela 10 – Relação entre o polimorfismo rs4671393 do gene *BCL11A* e os parâmetros hematológicos e laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Laboratoriais	Média (Mínimo – Máximo)			p Valor
	G/G	G/A	A/A	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,4 (2,1 – 2,7)	2,1 (1,8 – 2,7)	2,1 (2,1 – 2,1)	0,616
Hemoglobina (g/dL)	8,8 (5,37 – 12,3)	9,2 (6,7 – 11,1)	8,7 (8,1 – 9,2)	0,915
Hematócrito (%)	25,4 (15,1 – 38,5)	26,8 (18,9 – 33,8)	25,8 (23,3 – 29,3)	0,851
VCM (fL)	99,0 (75,1 – 137,3)	106,6 (89,5 – 125,8)	98,9 (81,6 – 122,3)	0,448
HCM (pg)	34,6 (24,7 – 48,6)	37,0 (31,0 – 44,7)	33,9 (24,9 – 44,0)	0,604
CHCM (g/dL)	34,8 (31,7 – 37,8)	35,4 (31,9 – 52,9)	34,0 (30,5 – 37,8)	0,604
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	8,7 (4,8 – 15,0)	10,1 (5,6 – 17,4)	11,4 (5,1 – 17,2)	0,024
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,4 (1,3 – 3,5)	4,3 (1,2 – 7,4)	6,2 (6,2 – 6,2)	0,126
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	319,0 (106,0 – 597,0)	390,8 (123,6 – 738,0)	431,8 (196,2 – 685,3)	0,027
Hemoglobina A ₂ (%)	3,1 (3,0 – 3,3)	3,0 (2,8 – 3,3)	2,5 (2,5 – 2,5)	0,326
Hemoglobina F (%)	11,5 (1,9 – 22,1)	16,4 (3,1 – 32,5)	14,4 (7,8 – 26,7)	0,259
Hemoglobina S (%)	82,2 (66,6 – 96,0)	78,6 (63,5 – 93,4)	80,9 (68,5 – 90,6)	0,449

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

A análise do SNP rs4671393 do gene *BCL11A* de acordo com os parâmetros laboratoriais, revelou uma influência sobre o número de leucócitos ($p=0,024$) e plaquetas ($p=0,019$). Pacientes com o genótipo homozigoto mutante A/A apresentaram maior número de leucócitos ($p=0,019$) e plaquetas ($p=0,027$) quando comparado com indivíduos homozigotos selvagem G/G (TABELA 10, FIGURA 8).

Figura 8 – Relação entre o polimorfismo rs4671393 do gene *BCL11A* e o número de leucócitos e plaquetas de pacientes com Anemia Falciforme.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Nota: * $p<0,05$. ** pós teste $p<0,05$.

Tabela 11 – Relação entre o polimorfismo rs4671393 do gene *BCL11A* e os parâmetros clínicos dos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Clínicos	Número absoluto (%)			p valor
	G/G	G/A	A/A	
Crises Álgicas				0,848
Ausência	3(10,3)	3(10,3)	0(0,0)	
Presença	26(89,7)	26(89,7)	9(100,0)	
Úlcera de MMI				0,033
Ausência	17(60,7)	10(52,6)	9(100,0)	
Presença	11(39,3)	9(47,4)	0(0,0)	
Litíase				0,448
Ausência	15(62,5)	7(46,7)	6(75,0)	
Presença	9(37,5)	8(53,3)	2(25,0)	
Trombose				0,489
Ausência	24(100,0)	14(93,3)	8(100,0)	
Presença	0(0,0)	1(6,7)	0(0,0)	
Necrose Óssea				0,349
Ausência	28(96,6)	17(85,0)	8(88,9)	
Presença	1(3,4)	3(15,0)	1(11,1)	
Priaprismo				0,846
Ausência	25(86,2)	18(90,0)	9(100,0)	
Presença	4(13,8)	2(10,0)	0(0,0)	
AVC				0,649
Ausência	26(89,7)	17(85,0)	9(100,0)	

Presença	3(10,3)	3(15,0)	0(0,0)	0,089
Hemossiderose				
Ausência	17(70,8)	14(93,3)	8(100,0)	
Presença	7(29,2)	1(6,7)	0(0,0)	
STA				0,230
Ausência	27(93,1)	16(80,0)	9(100,0)	
Presença	2(6,9)	4(20,0)	0(0,0)	
Convulsão				>0,999
Ausência	5(100,0)	5(100,0)	1(100,0)	
Presença	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	
Colelitíase				>0,999
Ausência	2(40,0)	2(40,0)	0(0,0)	
Presença	3(60,0)	3(60,0)	1(100,0)	
Astenia				>0,999
Ausência	4(80,0)	4(80,0)	1(100,0)	
Presença	1(20,0)	1(20,0)	0(0,0)	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: MMI=Membros inferiores, AVC= AVC = Acidente Vascular Cerebral; STA=Síndrome torácica aguda.

Para avaliar o efeito do polimorfismo sobre o número de leucócitos e plaquetas realizamos uma análise de regressão linear utilizando como covariáveis a HbS e o uso de HU. A análise de covariância revelou que não existe influência do polimorfismo rs4671393 do gene *BCL11A* ($p=0,60$) sobre o número de leucócitos quando este é controlado pela influência do uso de HU ($p=0,137$). Entretanto, a análise de covariância demonstrou que existe uma influência do polimorfismo SNP rs4671393 ($p=0,012$) sobre o número de leucócitos, porém independentemente dos níveis de HbS ($p=0,054$).

4.2.3 Influência do polimorfismo do gene *BCL11A* na região rs1186868 sobre os parâmetros clínicos do paciente com Anemia Falciforme

A análise do polimorfismo rs1186868 do gene *BCL11A* não demonstrou influência sobre os parâmetros laboratoriais e clínicos nos diferentes genótipos do referido SNP.

Tabela 12 – Relação entre o polimorfismo rs1186868 do gene *BCL11A* e os parâmetros laboratoriais nos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Laboratoriais	Média (Mínimo – Máximo)			p Valor
	C/C	C/T	T/T	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,2 (1,8 – 2,7)	2,2 (1,8 – 2,7)	2,1 (2,1 – 2,1)	0,374
Hemoglobina (g/dL)	8,7 (5,4 – 11,1)	9,1 (5,4 – 11,1)	9,3 (7,1 – 12,3)	0,329
Hematócrito (%)	25,0 (15,1 – 31,8)	26,5 (15,6 – 33,8)	27,3 (20,7 – 38,5)	0,244
VCM (fL)	105,6 (81,6 – 137,3)	105,6 (87,6 – 125,8)	88,7 (75,1 – 105,6)	0,059
HCM (pg)	36,9 (24,9 – 48,6)	36,8 (30,3 – 44,7)	30,4 (24,7 – 36,3)	0,485
CHCM (g/dL)	34,8 (30,5 – 37,8)	35,4 (31,9 – 52,9)	34,3 (31,9 – 37,5)	0,486

Leucócitos (10³/mm³)	10,1 (5,1 – 17,4)	9,1 (5,1 – 15,0)	9,6 (4,8 – 15,0)	0,551
Neutrófilos (10³/mm³)	4,8 (2,0– 7,4)	3,5 (3,5 – 3,5)	1,3 (1,3 – 1,3)	0,068
Plaquetas (10³/mm³)	368,0 (106,0 – 685,3)	357,7 (123,6 – 738,0)	367,0 (111,0 – 597,0)	0,903
Hemoglobina A₂ (%)	2,9 (2,5 – 3,3)	3,0 (3,0 – 3,0)	3,3 (3,3 – 3,3)	0,099
Hemoglobina F (%)	16,2 (7,8 – 29,7)	14,9 (3,1 – 32,5)	7,4 (1,9 – 20,1)	0,055
Hemoglobina S (%)	78,5 (65,5 – 90,6)	80,0 (63,5 – 93,4)	84,4 (66,6 – 96,0)	0,237

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Tabela 13 – Relação entre o polimorfismo rs1186868 do gene *BCL11A* e os parâmetros clínicos nos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Clínicos	Número absoluto (%)			p valor
	C/C	C/T	T/T	
Crises Algicas				0,112
Ausência	0(0,0)	4(16,7)	2(15,4)	
Presença	21(100,0)	20(83,3)	11(84,6)	
Úlcera de MMI				0,545
Ausência	16(80,0)	11(52,4)	7(53,8)	
Presença	4(20,0)	10(47,6)	6(46,2)	
Litíase				0,155
Ausência	9(52,9)	9(52,9)	7(63,6)	
Presença	8(47,1)	8(47,1)	4(36,4)	
Trombose				0,862
Ausência	17(100,0)	16(94,1)	10(90,9)	
Presença	0(0,0)	1(5,9)	1(9,1)	
Necrose Óssea				0,789
Ausência	19(90,5)	20(90,9)	12(92,3)	
Presença	2(9,5)	2(9,1)	1(7,7)	
Priaprismo				>0,999
Ausência	18(85,7)	21(95,5)	12(92,3)	
Presença	3(14,3)	1(4,5)	1(7,7)	
AVC				0,725
Ausência	18(85,7)	20(90,9)	11(84,6)	
Presença	3(14,3)	2(9,1)	2(15,4)	
Hemossiderose				0,324
Ausência	13(76,5)	16(94,1)	8(72,7)	
Presença	4(23,5)	1(5,9)	3(27,3)	
STA				0,306
Ausência	19(90,5)	18(81,8)	13(100,0)	
Presença	2(9,5)	4(18,2)	0(0,0)	
Convulsão				>0,999
Ausência	3(75,0)	5(100,0)	2(100,0)	
Presença	1(25,0)	0(0,0)	0(0,0)	
Colelitíase				0,567
Ausência	2(50,0)	3(60,0)	0(0,0)	
Presença	2(50,0)	2(40,0)	2(100,0)	
Astenia				0,200
Ausência	3(100,0)	5(100,0)	1(50,0)	
Presença	0(0,0)	0(0,0)	1(50,0)	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: MMI=Membros inferiores, AVC= AVC = Acidente Vascular Cerebral; STA=Síndrome torácica aguda.

4.3 Análise dos polimorfismos dos genes de reparo *ATM* e *ATR* em pacientes com Anemia Falciforme

A análise do polimorfismo dos genes de reparo em pacientes com AF revelou que o genótipo predominante nesses pacientes era o homozigoto selvagem para os dois genes, *ATM* e *ATR*, 60% (G/G) e 86% (C/C) respectivamente. É importante enfatizar que os indivíduos homozigotos mutantes foram raros, representando somente 1% da população estudada para os dois genes (TABELA 14). Baseado nesse dado, adotamos o modelo de **Modelo Genético de Dominância** (selvagem versus mutante + heterozigoto), como descrito Clarke *et al.* (2011), para realizar as análises de associações do polimorfismo dos genes de reparo entre as variáveis clínicas e laboratoriais.

A análise da frequência alélica demonstrou que o alelo G possui frequência de 0,79 na população em estudo e alelo A teve uma frequência de 0,21 para o gene *ATM*, mostrando a alta frequência do alelo selvagem na população. Semelhantemente, a frequência alélica para o SNP rs2229032 do gene *ATR* foi maior para o alelo selvagem C (0,92).

Tabela 14. Frequência genotípica dos genes *ATM* e *ATR* em pacientes com Anemia Falciforme

Polimorfismo dos genes de reparo	Número absoluto e percentual (%)	
	n	%
ATM rs228593		
Genótipo G/G (wt)	55	60
Genótipo G/A (ht)	36	39
Genótipo A/A (mt)	1	1
ATR rs2229032		
Genótipo C/C (wt)	82	86
Genótipo C/T (ht)	12	13
Genótipo T/T (mt)	1	1

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Genótipo Selvagem (wt), Genótipo heterozigoto (ht), Genótipo polimórfico (mt).

4.3.1 Influência do polimorfismo do gene *ATM* na região rs228593 sobre os parâmetros laboratoriais.

A análise de do polimorfismo genético rs228593 do gene *ATM* revelou associação com HbF ($p=0,023$), HbS ($p=0,010$) e plaquetas ($p=0,018$) (TABELA 15). Pacientes com genótipo heterozigoto e homozigoto mutante apresentaram maior quantidade de HbF e menor quantidade de HbS (TABELA 15, FIGURA 9 e 10). Semelhantemente, pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes possuem menor quantidade de plaquetas quando comparados a indivíduos homozigotos selvagens (G/G) (FIGURA 11, TABELA 14).

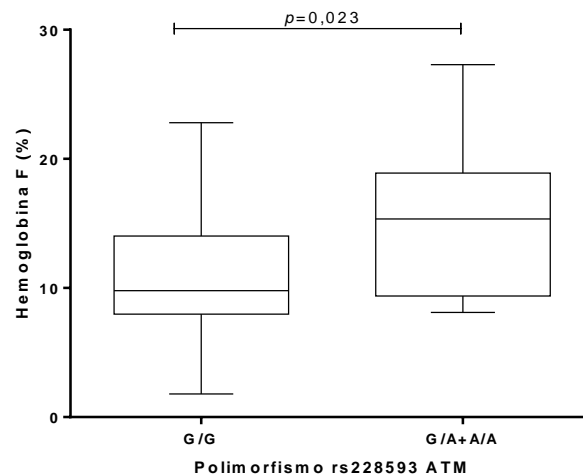
Tabela 15 – Relação entre o polimorfismo rs228593 do gene *ATM* e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Laboratoriais	Genótipos do <i>ATM</i>						<i>p</i> valor
	G/G			G/A+A/A			
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,3	1,3	3,5	2,4	1,4	3,3	0,694
Hemoglobina S (%)	9,0	5,8	11,7	9,2	5,8	11,	0,706
Hematócrito (%)	26,2	16,9	33,8	26,6	17,3	33,4	0,721
VCM (fL)	108,2	88,5	134,6	109,1	92,5	125,2	0,761
HCM (pg)	37,6	29,4	46,9	37,6	32,1	42,3	0,993
CHCM (g/dL)	34,6	31,4	37,7	34,6	31,9	37,5	0,917
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	9,3	4,4	15,9	10,1	5,3	17,4	0,349
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,6	2,0	9,5	4,8	1,2	9,5	0,726
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	369,4	221,	641,0	314,	187,0	422,	0,018
Reticulócitos	188341,0	47980,0	329300,0	202248,1	19500,0	355400,0	0,547
Hemoglobina A ₂ (%)	3,1	2,3	3,6	3,1	2,5	3,6	0,555
Hemoglobina F (%)	11,2	1,8	22,8	14,9	8,1	27,3	0,023
Hemoglobina S (%)	81,8	65,1	93,4	78,7	68,1	88,5	0,010

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes possuem maior quantidade de hemoglobina fetal do que pacientes homozigotos selvagens (FIGURA 9).

Figura 9 – Associação do polimorfismo rs228593 do gene *ATM* e a percentagem e hemoglobina fetal.

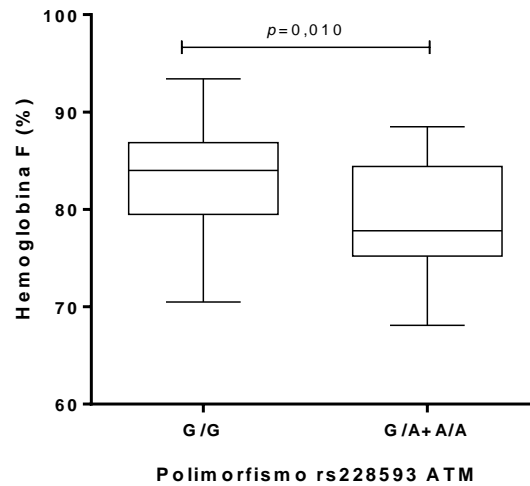


Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Teste T <0,005.

Pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes possuem menor quantidade de hemoglobina fetal do que pacientes homozigotos selvagens (FIGURA 10).

Figura 10 – Associação do polimorfismo rs228593 do gene *ATM* e a percentagem de

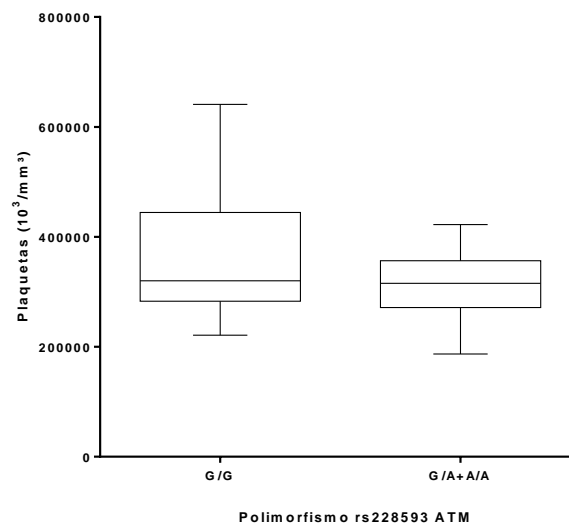
hemoglobina falciforme (F). Teste T <0.05.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Teste T <0,05.

Pacientes homocigotos mutantes e heterocigotos possuem menor quantidade de hemoglobina fetal, do que pacientes homocigotos selvagens (FIGURA 11).

Figura 11 – Associação do polimorfismo rs228593 do gene *ATM* e o número de plaquetas.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Teste T <0,05.

Análise do polimorfismo rs228593 do gene *ATM* não apresentou nenhuma associação com os parâmetros clínicos da doença (TABELA 16).

Tabela 16 – Relação entre o polimorfismo rs228593 do gene *ATM* e os parâmetros clínicos nos pacientes com Anemia Falciforme.

Dados clínicos	Polimorfismo do ATM				p Valor
	G/G		G/A + A/A		
	n	%	n	%	
Crise Álgica					
Ausência	1	2,0%	3	5,9%	0,316
Presença	27	52,9%	20	39,2%	
Úlcera de MMI					
Ausência	18	36,7%	15	30,6%	0,910
Presença	9	18,4%	7	14,3%	
Litíase					
Ausência	4	44,4%	1	11,1%	>0,999
Presença	3	33,3%	1	11,1%	
Trombose					
Ausência	7	77,8%	2	22,2%	>0,999
Presença	0	0,0%	0	0,0%	
Necrose óssea					
Ausência	26	52,0%	22	44,0%	>0,999
Presença	1	2,0%	1	2,0%	
Priapismo					
Ausência	27	54,0%	23	46,0%	>0,999
Presença	0	0,0%	0	0,0%	
AVC					
Ausência	25	50,0%	20	40,0%	0,651
Presença	2	4,0%	3	6,0%	
Hemossiderose					>0,999
Ausência	6	66,7%	2	22,2%	
Presença	1	11,1%	0	0,0%	
STA					
Ausência	24	48,0%	18	36,0%	0,444
Presença	3	6,0%	5	10,0%	
Dispneia					
Ausência	18	43,9%	15	36,6%	0,238
Presença	2	4,9%	6	14,6%	
Convulsão					
Ausência	20	48,8%	19	46,3%	0,488
Presença	0	0,0%	2	4,9%	
Colelitíase					
Ausência	11	26,8%	14	34,1%	0,530
Presença	9	22,0%	7	17,1%	
Astenia					
Ausência	19	47,5%	18	45,0%	>0,999
Presença	1	2,5%	2	5,0%	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Membros inferiores (MMI), Acidente Vascular Cerebral (AVC); Síndrome torácica aguda (STA).

4.3.2 Influência do polimorfismo do gene *ATR* na região rs2229032 sobre os parâmetros laboratoriais e clínicos.

A análise dos polimorfismos rs2229032 do gene *ATR* não demonstrou nenhuma associação com as variáveis laboratoriais e clínicas dos pacientes com anemia falciforme.

Tabela 17 – Relação entre o polimorfismo rs2229032 do gene *ATR* e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme.

Parâmetros Laboratoriais	Genótipos do <i>ATR</i>						<i>p</i> valor
	C/C			C/T			
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,35	1,30	3,50	2,44	2,10	2,80	>0,05
Hemoglobina (g/dL)	9,12	5,80	11,70	9,32	8,10	11,10	>0,05
Hematócrito (%)	26,40	16,90	33,81	26,46	23,90	30,60	>0,05
VCM (fL)	108,90	88,57	134,62	109,51	92,50	122,07	>0,05
HCM (pg)	37,76	29,43	48,42	38,56	32,50	45,07	>0,05
CHCM (g/dL)	34,63	31,45	37,77	34,99	33,03	36,92	>0,05
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	9,7	5,3	17,4	9,5	4,4	14,0	>0,05
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	4,5	1,3	9,5	5,5	2,4	9,5	>0,05
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	347,7	187,0	641,0	300,1	229,7	423,2	>0,05
Reticulócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	200,2	19,5	355,4	165,1	108,2	255,3	>0,05
Hemoglobina F (%)	12,85	1,80	27,30	13,55	7,90	24,90	>0,05
Hemoglobina A2 (%)	3,13	2,30	3,60	3,19	2,50	3,60	>0,05
Hemoglobina S (%)	80,82	68,10	93,40	81,68	71,20	88,50	>0,05

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Tabela 18 – Relação entre o polimorfismo rs2229032 do gene *ATR* e os parâmetros clínicos dos pacientes com Anemia Falciforme.

Dados clínicos	Polimorfismo do <i>ATR</i>				<i>p</i> Valor
	C/C		C/T		
	n	%	n	%	
Crise Álgica					>0,05
Ausência	5	7,7	0	0,0	
Presença	52	80	8	12,3	
Úlcera de MMI					>0,05
Ausência	39	61,9	7	11,1	
Presença	16	25,4	1	1,6	
Litíase					>0,05
Ausência	14	63,6	3	13,6	
Presença	5	22,7	0	0,0	
Trombose					>0,05
Ausência	19	86,4	3	13,6	
Presença	0	0,0	0	0,0	
Necrose óssea					>0,05
Ausência	52	81,63	8	12,5	

Presença	4	6,3	0	0,0	
Priapismo					>0,05
Ausência	55	85,9	8	12,5	
Presença	1	1,6	0	0,0	
AVC					>0,05
Ausência	51	79,7	8	12,5	
Presença	5	7,8	0	0,0	
Hemossiderose					>0,05
Ausência	18	81,8	3	13,6	
Presença	1	4,5	0	0,0	
STA					>0,05
Ausência	48	75	8	12,5	
Presença	8	12,5	0	0,0	
Dispneia					>0,05
Ausência	37	68,5	7	13	
Presença	10	18,5	0	0,0	
Convulsão					>0,05
Ausência	44	81,5	7	13	
Presença	3	5,6	0	0,0	
Colelitíase					>0,05
Ausência	32	59,3	5	9,3	
Presença	15	27,8	2	3,7	
Astenia					>0,05
Ausência	43	81,1	6	11,3	
Presença	3	5,7	1	1,9	

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. Legenda: Membros inferiores (MMI), Acidente Vascular Cerebral (AVC); Síndrome torácica aguda (STA).

5 DISCUSSÃO

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são variações da sequência de DNA que ocorrem quando um único nucleotídeo na sequência do genoma é alterado. Os SNPs são uma ferramenta importante para o estudo do genoma humano. A aplicação da análise de SNPs em doenças humanas permite a exploração da influência de polimorfismos genéticos na suscetibilidade a doenças, sensibilidade/resistência a medicamentos e, nas variações clínicas dos pacientes (BROOKES *et al.*, 1999; KARKI *et al.*, 2015).

As bases genéticas associadas a clínica dos pacientes com AF é ainda pouco compreendida, sobretudo a sua influência nos processos fisiopatológicos que apresentam uma natureza interligada e que culminam com diferentes fenótipos. As descobertas biológicas feitas durante estudos de associação genética demonstraram o papel do gene *BCL11A* na modulação da expressão do gene que codifica a HbF. O polimorfismo do gene *BCL11A* atualmente tem sido utilizado como uma ferramenta para prever, juntamente com outros loci genéticos, os níveis de HbF (GARDNER *et al.*, 2016). O presente trabalho demonstrou uma associação dos polimorfismos genéticos do gene *BCL11A* nas rs7557939 e rs4671393 com diversos parâmetros clínicos e laboratoriais. Além disso, para a nossa surpresa, verificou-se que as variantes genótípicas do polimorfismo do gene *ATM* na rs228593 demonstraram modular os níveis de HbF e de HbS.

A HbF pode inibir a polimerização da HbS, sendo, portanto, considerada um importante modulador da fisiopatologia na AF. Seu aumento reduz a concentração intracelular média de HbS, diminuindo, assim, as consequências fisiopatológicas causadas pela polimerização da mesma. Na maioria dos adultos com AF, os níveis de HbF estão aumentados, no entanto a magnitude deste aumento é muito variável. Sua concentração e distribuição entre os eritrócitos são hereditárias e a sua expressão é regulada por elementos ligados ao complexo do gene da β -globina que, por sua vez, são associados aos haplótipos do gene da β -globina, aos elementos associados ao gene *BCL11A* e à região intergênica *HBSIL-MYB*. Destaca-se que a produção de HbF é restrita a um pequeno número de precursores eritroides conhecido como células-F e que as bases genéticas responsáveis pela distribuição de HbF entre essas células ainda não foram estudadas (AKINSHEYE *et al.*, 2011; STEINBERG *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos realizaram associação de estudos de genomas com a quantidade de HbF em pacientes com AF (ADEYEMO *et al.*, 2018). SNPs comuns no gene *BCL11A* foram associados com os níveis de células F ou HbF em populações europeias e sardianas (MENZEL *et al.*, 2007; UDA *et al.*, 2008). Uda *et al.* (2008) demonstraram que o SNP intrônico rs11886868 do gene *BCL11A*, correlaciona-se fortemente com os níveis de HbF. Lettre *et al.*

(2008) genotiparam os SNPs rs11886868, rs4671393 e rs7557939 em um coorte de pacientes africanos e brasileiros com doença falciforme e replicaram fortemente a associação descrita pelo estudo de Uda *et al.* (2008), ou seja, demonstraram, associações fortes dos SNPs com variações no nível de HbF. No presente estudo, encontramos uma associação entre indivíduos com o genótipo heterozigoto (G/A) para polimorfismo do gene *BCL11A* na região rs7557939 e o aumento da quantidade de HbF. Não observamos associação de HbF com os outros SNPs estudados, indicando, provavelmente, que o polimorfismo rs7557939 é o principal modulador genético na presente população.

A avaliação do SNP rs4671393 do gene *BCL11A* em populações africanas (WONKAM *et al.*, 2014) e brasileiras (LETTRE *et al.*, 2008) demonstrou, independentemente do nível de HbF, sua influência sobre diversos parâmetros hematológicos, incluindo a contagem de leucócitos e de plaquetas. Avaliaram, também, que essa modulação no nível de leucócitos e plaquetas foi independente do uso da HU. Portanto, é provável que o SNP rs4671393 seja um importante marcador biológico na fisiopatologia da AF.

É importante destacar que as plaquetas são essenciais para a hemostase e também podem promover a inflamação. A ativação plaquetária é elevada em pacientes com AF e, durante as crises vaso oclusivas, são mais marcantes. As plaquetas ativadas promovem a adesão do eritrócito falciforme ao endotélio vascular humano secretando trombospondina, podendo, assim, contribuir para trombose e hipertensão pulmonar observada nos pacientes com AF. As plaquetas, também, podem se ligar aos eritrócitos, monócitos e neutrófilos para formar agregados e marcar o início do processo inflamatório (ZHANG *et al.*, 2016; CURTIS *et al.*, 2015). Portanto, o aumento de plaquetas em pacientes com AF pode estar associado a um estado inflamatório mais intenso e, conseqüentemente, um pior prognóstico. Sendo assim o rs4671393 pode identificar pacientes com um prognóstico desfavorável em AF.

Na avaliação dos polimorfismos dos genes de reparo, demonstramos uma associação entre os pacientes que apresentavam o alelo mutante do SNP rs228593 (pacientes heterozigotos e homozigotos mutantes) do gene *ATM* e os níveis aumentados de HbF. Zhu *et al.* (2014), demonstraram que o uso de hidroxiuréia aumentou a quantidade de HbF em precursores eritroides. Este mesmo grupo demonstrou que a HU aciona a proteína ATM que, conseqüentemente, estimula intracelularmente uma via de transdução de sinais mediadas pelo fator nuclear kB (NF-kB), o qual induz a ativação de uma proteína sinalizadora denominada SAR1 (*secretion-associated and ras-related*). Esta, por vez, aciona a c-Jun associada à proteína G (JNK) e leva a produção de HbF nos precursores eritróides. Green, (2014), em comentário ao artigo de Zhu *et al.* (2014) cita que a HU depleta um *pool* de desoxirribonucleotídeo e inibe

a replicação e o reparo do DNA, gerando danos no DNA. Green, (2014) enfatiza que a resposta ao dano ao DNA induzido pela hidroxiureia parece ser o responsável pela indução de HbF através de um mecanismo de sinalização genérica, mas que direciona a ativação da γ -globina através de SAR1 em progenitores eritróides. Sendo assim, o uso diário e repetitivo de HU desloca o desenvolvimento eritroide para uma produção melhorada de HbF através da ativação de uma via de estresse celular. Nesse contexto, demonstramos que o ATM pode ser, também, um importante modulador dos níveis de HbF em pacientes com AF. Ademais, destacamos que as variações polimórficas do gene *ATM* podem gerar modulações diferentes nos níveis de HbF em pacientes com AF e isso pode estar diretamente associado à resposta ao tratamento com HU.

O presente trabalho demonstrou uma associação de moduladores genéticos (*BCL11A* e *ATM*) com importantes marcadores biológicos da AF, como é o caso da HbF. A HbF é a responsável por inibir a polimerização da HbS, um dos principais eventos fisiopatologia da doença. Dessa forma, compreender como níveis de HbF são modulados são de fundamental importância e precisam ser melhor estudados. Portanto, a HbF pode ser o alvo molecular mais importante para o desenvolvimento novas terapias futura para pacientes com AF. Estudos futuros poderão validar essa múltiplas variantes genéticas, incluindo as variantes para o gene *ATM*, na modulação dos subfenótipos comuns da doença. Até o presente momento, não existe relatos da função do gene *ATM* em pacientes com AF. Estudos mais complexos que contemplem coortes de pacientes, novos métodos de genotipagem de alto rendimento, juntamente com técnicas analíticas como redes bayesianas, podem gerar assinaturas genéticas de pacientes com AF que poderão ser importantes para a prática clínica.

6 CONCLUSÃO

- Pacientes apresentaram um perfil clínico e laboratorial compatível com a doença em estudo. O tratamento com HU influenciou no aumento dos parâmetros VCM e HCM, e diminuição da leucometria e dos neutrófilos, e reduziu significativamente a ocorrência de úlcera de membros inferiores (MMI);
- A frequência dos genótipos para o gene *BCL11A* na região rs7557939 foi de 27,1% (A/A), 40,7% (A/G) e 32,2% (G/G); região rs1186868 foi de 38,9% (C/C), 38,9% (C/T) e 22,2% (T/T); região rs4671393 foi de 47,3% (C/C), 38,2% (C/T) e 14,5% (T/T);
- A frequência dos genótipos foi de 60% (G/G), 39% (G/A) e 1% (A/A) para o gene *ATM*; e para o gene *ATR*, foi de 86% (C/C), 13% (C/T) e 1% (T/T);
- O polimorfismo do gene *BCL11A*, na região rs7557939 revelou uma relação entre os diferentes genótipos, o uso de HU e com os níveis de HbF, VCM e HCM, leucócitos e plaquetas, crises algicas e o número de úlceras do MMI. Na análise do polimorfismo genético rs228593 do gene *ATM* foi evidenciado associação para os parâmetros laboratoriais (HbF, HbS e plaquetas), e não houve para os parâmetros clínicos. A análise dos polimorfismos rs2229032 do gene *ATR* não demonstrou nenhuma associação com as variáveis laboratoriais e clínicas em pacientes com anemia falciforme.

REFERÊNCIAS

- ABAIS, J. M. *et al.* Contribution of endogenously produced reactive oxygen species to the activation of podocyte NLRP3 inflammasomes in hyperhomocysteinemia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 211-220, 2014.
- ADEYEMO, T.A. *et al.* A survey of genetic fetal-haemoglobin modifiers in Nigerian patients with sickle cell anaemia. **Plos One**, v. 13, n. 6, p. e0197927, 2018.
- AKINSHEYE, I. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, p. blood-2011-03-325258, 2011.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 78-86, 2018.
- ALEXANDER, A.; WALKER, C. L. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. **Cell cycle**, v. 9, n. 18, p. 3709-3710, 2010.
- ANDEGEKO, Y. *et al.* Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 41, p. 38224-38230, 2001.
- ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1469-1483, 2007.
- BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. **American journal of hematology**, v. 87, n. 3, p. 338-338, 2011.
- BAO, S. *et al.* ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 969, 2001.
- BAU, D.T. *et al.* Association between DNA repair gene ATM polymorphisms and oral cancer susceptibility. **The Laryngoscope**, v. 120, n. 12, p. 2417-2422, 2010.
- BEAUDET, A.L; TSUI, L.C. A suggested nomenclature for designating mutations. **Human mutation**, v. 2, n. 4, p. 245-248, 1993.
- BECKMAN, J. S. *et al.* Oxidative chemistry of peroxynitrite. **Methods in enzymology**. v. 233, p. 229-240, 1994.
- BEERS, E. J. V.; WIJK, R. V. Oxidative stress in sickle cell disease; more than a DAMP squib. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 239-250, 2018.
- BELCHER, J. D. *et al.* Heme degradation and vascular injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 2, p. 233-248, 2010.
- BELLI, M.; SAPORA, O; TABOCCHINI, M. A. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. **Journal of radiation research**, v. 43, n. Suppl, p. S13-S19, 2002.

- BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS letters**, v. 585, n. 11, p. 1625-1639, 2011.
- BHANUSHALI, A.A. *et al.* 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, n. 1, p. 4–8, 2015.
- BOHGAKI, T.; BOHGAKI, M.; HAKEM, R. DNA double-strand break signaling and human disorders. **Genome integrity**, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.
- BOULEY, J. *et al.* A new phosphorylated form of Ku70 identified in resistant leukemic cells confers fast but unfaithful DNA repair in cancer cell lines. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27980, 2015.
- BRENERMAN, B. M.; ILLUZZI, J. L.; WILSON III, D. M. Base excision repair capacity in informing healthspan. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 12, p. 2643-2652, 2014.
- BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 183-189, 1985.
- BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.
- BRUGNARA, C. Erythrocyte dehydration in pathophysiology and treatment of sickle cell disease. **Current opinion in hematology**, v. 2, n. 2, p. 132-138, 1995.
- BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 762-769, 1997.
- BUTKIEWICZ, D. *et al.* Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 4, p. 593-597, 2001.
- CARDOSO, G. L. *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, Molecules, and Diseases**, v. 53, n.4, p.176-179, 2014.
- CHEN, Z. *et al.* BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 42, n. 2, p. 144-149, 2009.
- CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, 2012.
- CHOU, A. C.; FITCH, C. D. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. **The Journal of clinical investigation**, v. 68, n. 3, p. 672-677, 1981.
- CLARKE, G.M; ANDERSON, C.A; PETTERSSON, F.H.; et al. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. **Nature protocols**, v. 6, n. 2, p. 121 - 133, 2011.
- CLOUAIRE, T.; MARNEF, A.; LEGUBE, G. Taming tricky DSBs: ATM on duty. **DNA repair**, v. 56, p. 84-91, 2017.

COLIN, Y.; LE VAN KIM, C.; EL NEMER, W. Red cell adhesion in human diseases. **Current opinion in hematology**, v. 21, n. 3, p. 186-192, 2014.

COLLINS, A.; LONJOU, C.; MORTON, N. E. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15173-15177, 1999.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2-3, p. 263-299, 2018.

CURTIS, Susanna A. *et al.* Elevated steady state WBC and platelet counts are associated with frequent emergency room use in adults with sickle cell anemia. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0133116, 2015.

DE ALMEIDA, C. B.; KATO, G. J.; CONRAN, N. Inflammation and sickle cell anemia. In: **Sickle Cell Anemia: from basic science to clinical practice**. p. 177-211, 2016.

FERNANDES, Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. **Life sciences**, v. 178, p. 100-108, 2017.

GARDNER, K. *et al.* A Genetic Predictive Model for HbF in Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 319, 2016.

GLAZER, P. M. *et al.* Focus: 50 Years of DNA Repair: The Yale Symposium Reports: Hypoxia and DNA Repair. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 86, n. 4, p. 443-451, 2013.

GORRE, M. *et al.* Significance of ATM gene polymorphisms in chronic myeloid leukemia—a case control study from India. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 2, p. 815-21, 2016.

GRACA-SOUZA, A.V. *et al.* Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood** v. 99, n. 11, p. 4160–4165, 2002.

GREEN, N. S. A step forward back to (induced) fetal. **Blood**, v. 124, n. 7, p. 993-995, 2014.

GUPTA, A. K. *et al.* Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. **FEBS letters**, v. 584, n. 14, p. 3193-3197, 2010.

HABER, J. E. *et al.* Repairing a double–strand chromosome break by homologous recombination: revisiting Robin Holliday's model. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1441, p. 79-86, 2004.

HEBBEL, R. P. Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 28, n. 2, p. 181-198, 2014.

HERRICK, J.B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**, United States, n. 74, v. 3, p. 179–184, 2001.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475-1485, 2009.

HUGHES, A. L. *et al.* Genome-wide SNP typing reveals signatures of population history. **Genomics**, v. 92, n. 1, p. 1-8, 2008.

HUSAIN, M.; HARTMAN, A. D.; DESAI, P. Pharmacogenomics of sickle cell disease: steps toward personalized medicine. **Pharmacogenomics and personalized medicine**, v. 10, p. 261-265, 2017.

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA repair**, v. 12, n. 8, p. 620-636, 2013.

JEPPESEN, D.K; BOHR, V.A; STEVNSNER, T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. **Progress in neurobiology**, v. 94, n. 2, p. 166-200, 2011.

JONECKIS, C. C. *et al.* Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. **Blood**, v. 82, n. 12, p. 3548-3555, 1993.

KAO, J. *et al.* Cellular response to DNA damage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, n. 1, p. 243-258, 2005.

KARKI, R. *et al.* Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 37, p. 1-7, 2015.

KASSAM, S. *et al.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs): history, biotechnological outlook and practical applications. **Current Pharmacogenomics**, v. 3, n. 3, p. 237-245, 2005.

KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18, 2018.

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, n. 1, p. 37-47, 2007.

KIM, P. M. *et al.* Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 21, p. 4352-4360, 2001.

KOSHY, M. *et al.* Leg ulcers in patients with sickle cell disease [see comments]. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1403-1408, 1989.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology letters**, v. 157, n. 3, p. 175-188, 2005.

KUYPERS, F. A. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. **ASH Education Program Book**, v. 2007, n. 1, p. 68-73, 2007.

LEE, K.M *et al.* Genetic polymorphisms of ataxia telangiectasia mutated and breast cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 4, p. 821-825, 2005.

LEMPIÄINEN, H.; HALAZONETIS, T. D. Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. **The EMBO journal**, v. 28, n. 20, p. 3067-3073, 2009.

LETTRE, G. *et al.* DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and β -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1-6, 2008.

LIEBER, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 1, p. 1-5, 2008.

LO, Y. L. *et al.* ATM polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers. **Lung Cancer**, v. 69, n. 2, p. 148-154, 2010.

MANFREDINI, V. *et al.* A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 19, n. 1/2, p. 3-6, 2013.

MARÉCHAL, A.; ZOU, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 9, p. 1-18, 2013.

MENZEL, S. *et al.* A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nature genetics**, v. 39, n. 10, p. 1197, 2007.

MINNITI, C. P. *et al.* Leg ulcers in sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 85, n. 10, p. 831-833, 2010.

MORIO, T. Recent advances in the study of immunodeficiency and DNA damage response. **International journal of hematology**, v. 106, n. 3, p. 357-365, 2017.

NAGEL, R. L. *et al.* Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 2, p. 670-672, 1979.

NCBI. NCBI dbSNP. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>. Acesso em: 29 out. 2018.

NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. The intracellular polymerization of sickle hemoglobin and its relevance to sickle cell disease. **Blood**, v. 58, n. 6, p. 1057-1068, 1981.

NOLAN, V. G. *et al.* Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β /BMP pathway. **British journal of haematology**, v. 133, n. 5, p. 570-578, 2006.

OKUMURA, J.V.; LOBO, C.L.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, vol.35 n.1, p. 71-72, 2013.

OZTURK, S.; DEMIR, N. DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. **Histology and histopathology**, v. 26, n. 4, p. 505-517, 2011.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

REITER, C. D.; GLADWIN, M. T. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. **Current opinion in hematology**, v. 10, n. 2, p. 99-107, 2003.

RIBEIRO, H. L. *et al.* Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematological oncology**, v. 33, n. 4, p. 220-228, 2015.

ROBERTSON, K.D.; WOLFFE, A.P. DNA methylation in health and disease. **Nature reviews genetics**, v. 1, n. 1, p. 11, 2000.

SAFFARZADEH, M. *et al.* Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e32366, 2012.

SANKARAN, V. G. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1839-1842, 2008.

SAÚDE. Lançada campanha para desmistificar a anemia falciforme. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2012/11/lancada-campanha-para-desmistificar-a-anemia-falciforme>>. Acesso em: 05 out 2018.

SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 10, p. a011783, 2013.

SHIEH, S. Y. *et al.* DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 325-334, 1997.

SILICIANO, J. D. *et al.* DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. **Genes & development**, v. 11, n. 24, p. 3471-3481, 1997.

SMITH, E. C. *et al.* Strict in vivo specificity of the Bcl11a erythroid enhancer. **Blood**, p. () blood-2016-08-736249, 2016.

SOUZA, J.M. *et al.* Fisiopatologia da anemia falciforme. **Revista Transformar**. v. 8, n.8, p. 162-178, 2016. Disponível em:<<http://www.fsj.edu.br/transformar/index.php/transformar/article/view/60>>. Acesso em: 05 out 2018.

SPIECKER, M. *et al.* Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **Journal of leukocyte biology**, v. 63, n. 6, p. 732-739, 1998.

SPIECKER, M.; PENG, H. B.; LIAO, J. K. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I κ B α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30969-30974, 1997.

- SPITZ, M. R. *et al.* Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. **Cancer Research**, v. 61, n. 4, p. 1354-1357, 2001.
- STEINBERG, M. H. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? . **Blood**, v. 123, n. 4, p. 481-485, 2014.
- STERN, M. C. *et al.* DNA repair gene XRCC3 codon 241 polymorphism, its interaction with smoking and XRCC1 polymorphisms, and bladder cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, n. 9, p. 939-943, 2002.
- STUART, M. J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, 2004.
- STURGIS, E. M. *et al.* DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 128, n. 9, p. 1084-1088, 2002.
- TAWFIK, N.S.; SPRUIT, M. R. The SNPcurator: literature mining of enriched SNP-disease associations. **Database**, v. 2018, 2018.
- TOMESCU, D. *et al.* Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 3, p. 403-408, 2001.
- UDA, M. *et al.* Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1620-1625, 2008.
- URESHINO, H. *et al.* Acute Megakaryoblastic Leukemia with Myelodysplasia-related Changes Associated with ATM Gene Deletion. **Internal Medicine**, v. 55, n. 12, p. 1625-1629, 2016.
- VAN GOLEN, R. F.; VAN GULIK, T. M.; HEGER, M. The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 23, n. 3, p. 69-84, 2012.
- VÁSQUEZ-VIVAR, J. *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9220-9225, 1998.
- WAGENER, F. A. *et al.* Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 2, p. 52-54, 2001.
- WALSH, K. E. *et al.* Medication adherence among pediatric patients with sickle cell disease: a systematic review. **Pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 1175-1183, 2014.
- WARE, R. E. *et al.* Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311-323, 2017.
- WATTERS, D. J. Oxidative stress in ataxia telangiectasia. **Redox Rep.**, v. 8, n. 1, p. 23-29, 2003.
- WEBER, A. M.; RYAN, A. J. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. **Pharmacology**

& therapeutics, v. 149, p. 124-138, 2015.

WEST, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 6, p. 435-445, 2003.

WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sick cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 34, n. 9, p. 926-932, 2007.

WONKAM, Ambroise *et al.* 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.

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. 207-214, 2007.

ZHANG, Dachuan *et al.* Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801-809, 2016.

ZHU, J. *et al.* Hydroxyurea-inducible SAR1 gene acts through the Gi α /JNK/Jun pathway to regulate γ -globin expression. **Blood**, p(). blood-2013-10-534842, 2014.

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 **“Influência dos polimorfismos do gene BCL11A na função renal de pacientes com Anemia Falciforme: correlação com novos biomarcadores de diagnóstico precoce”**, que tem como objetivo principal avaliar o uso de novos biomarcadores de lesão renal precoce, associando-os com polimorfismos do gene BCL11A. 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 e uma amostra de urina para que a pesquisa seja realizada. As coletas das amostras serão realizadas 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: / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data: / /



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 “**AValiação DE POLIMORFISMOS DE GENES DE REPARO DE FITA DUPLA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**”, que tem como objetivo principal é avaliar os polimorfismos de genes de reparo de fita dupla em pacientes com Anemia Falciforme. 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 1 (uma) amostra de sangue para que a pesquisa seja realizada. As coletas das amostras serão realizadas no Ambulatório de Hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). 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 Islara Rodrigues Cavalcante, 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: / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data: / /

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE BCL11A NA FUNÇÃO RENAL DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: CORRELAÇÃO COM NOVOS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOCE

Pesquisador: Talyta Ellen de Jesus dos Santos

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 46931915.9.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.228.634

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico com pacientes adultos com diagnóstico molecular de Anemia de Células Falciformes, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza, Ceará, no período de abril de 2015 a abril de 2017

Objetivo da Pesquisa:

Primário: Avaliar o uso de novos biomarcadores de lesão renal precoce, associando-os com polimorfismos do gene BCL11A.

Secundários: Investigar a disfunção renal em pacientes com anemia falciforme, utilizando marcadores tradicionais de função renal; -Avaliar o papel do KIM-1, NGAL, NAG, MCP-1 como novos biomarcadores para a detecção de alterações renais precoces; Investigar os polimorfismos do gene BCL11A nos pacientes; Correlacionar os polimorfismos do gene BCL11A com as manifestações clínicas dos pacientes e Investigar a influência de polimorfismos no gene BCL11A nos marcadores de função renal.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 1.228.634

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos - Segundo a pesquisadora são mínimos e haverá o cuidado de reduzi-los através de cuidados na coleta de sangue do participante da pesquisa.

Benefícios - Descobrir anormalidades no funcionamento dos rins e oferecer o tratamento adequado dos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é factível e foram contempladas as pendências apontadas em parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de Apresentação obrigatória presentes e adequados, de acordo com a Resolução 466/12 do CNS/CONEP.

Pendências Atendidas.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo sido atendidas as pendências constantes de parecer anterior o Projeto reúne condições para a sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 15 de Setembro de 2015

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodofoTeófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 Fax: (85)3281-4961 E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

CENTRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -
HEMOCE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE GENES DE REPARO DE FITA DUPLA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: ISLARA RODRIGUES CAVALCANTE

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 01684918.8.0000.8152

Instituição Proponente: SECRETARIA DA SAUDE DO ESTADO DO CEARA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.979.265

Apresentação do Projeto:

A anemia falciforme (AF) é uma doença monogênica causada por uma mutação pontual no gene da -globina que resulta na produção de uma hemoglobina S (HbS) anormal, em homozigose. A concentração da Hemoglobina Fetal (HbF) é um importante modulador clínico na doença. A

concentração da mesma varia de acordo com os haplótipos do gene da hemoglobina S. A AF é caracterizada por apresentar um processo inflamatório crônica, aumento do estresse oxidativo, risco de infecções, os quais, juntamente com a hipóxia, têm sido associados à instabilidade genética e funcionam como um fator de risco para o desenvolvimento de alterações genéticas. A instabilidade genética pode surgir a partir de uma

resistência a apoptose mediada por hipóxia e diminuição de mecanismos de reparo do DNA, levando ao aumento das taxas de mutagênese. A proteína quinase de ataxia telangiectasia mutada (ATM) e o ATR (ataxia telangiectasiaand Rad3-related) participam na regulação a resposta celular às quebras de cadeia dupla do DNA. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os polimorfismos dos genes de reparo de fita dupla (ATM e ATR) e sua associação com a clínica e os dados laboratoriais nos paciente com AF. Trata-se de um estudo transversal, analítico e observacional com 50 pacientes com AF, em estado basal, com e sem uso de Hidroxiuréia (HU) e em 50 indivíduos controles doadores de sangue.

**CENTRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -
HEMOCE**



Continuação do Parecer: 2.979.265

Os dados clínicos e laboratoriais (hemograma e eletroforese da hemoglobina) foram obtidos através dos prontuários. Os polimorfismos genéticos serão avaliados pelo ensaio de discriminação alélica para genotipagem com o uso de oligonucleotídeos e sondas Taqman® AssayProbes através técnica de qPCR. As diferenças entre as distribuições alélicas e genotípicas, os modelos genéticos e a análise do Equilíbrio de Hardy-Weiberg ($p > 0,05$) serão analisadas com o teste de qui-quadrado (com um grau de liberdade) ou teste exato de Fisher.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os polimorfismos de genes de reparo de fita dupla em pacientes com Anemia Falciforme.

Objetivo Secundário:

- Analisar polimorfismos do gene ATM rs228593/ ATR rs2229032;-Associar os achados moleculares com as variáveis clínicas encontradas em pacientes com anemia falciforme;
- Analisar e caracterizar o perfil sociodemográfico e características hematológicas de pacientes com anemia falciforme, tratados com hidroxiuréia e não tratados;
- Associar os polimorfismos de gene de reparo ATM, ATR à fisiopatologia da anemia falciforme;
- Associar os polimorfismos de gene de reparo ATM, ATR à utilização da Hidroxiuréia (dose/tempo);- Associar os polimorfismos à quantidade de HbF dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos relacionados à pesquisa serão relacionados a aspectos morais para as situações nas quais os casos preencherem os critérios de inclusão do estudo somente pelos registros do prontuário. Não haverá exames complementares, haverá um risco mínimo relacionado à coleta de sangue, considerados estatisticamente insignificantes, quando respeitado as normas técnicas padrões.

Benefícios:

A pesquisa vai contribuir com informações científicas para a instituição e para os médicos e pacientes afim de estimar como o os polimorfismos podem afetar na clínica e no tratamento de anemia falciforme.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Anemia Falciforme é uma doença com risco de vida, caracterizada por graves episódios de dor e danos crônicos nos órgãos levando, muitas vezes, à morte prematura. Embora isso seja causado por uma única alteração genética, há uma grande heterogeneidade na apresentação clínica

**CENTRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -
HEMOCE**



Continuação do Parecer: 2.979.265

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O referido projeto apresentou todos os termos e compromissos necessários para aprovação e viabilidade ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará ANALISOU e NÃO INDICOU PENDÊNCIAS concluindo parecer favorável à realização do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado por unanimidade pelo comite. Sem pendencias eticas e pode contribuir para melhor entendimento e compreensao da anemia falciforme.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 24 de Outubro de 2018

Assinado por:

JOAO MARCOS DE MENESES E SILVA
(Coordenador(a))

Endereço: Av. José Bastos nº 3390 - Rodolfo Teófilo

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.431-086

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3101-2273

E-mail: drjoao Marcosmeneses@hotmail.com

ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO

International Journal of Hematology
Clinical difference between twins with sickle cell anemia
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Clinical difference between twins with sickle cell anemia
Article Type:	Case Report
Section/Category:	Central/South America
Corresponding Author:	Marilia Rocha Laurentino, M.D. Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará Fortaleza, Ceara BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marilia Rocha Laurentino, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marilia Rocha Laurentino, M.D. Tarcisio Paulo Almeida Filho, Pos Graduation Program in Pharmaceutical Sciences Pedro Aurio Maia Filho, Pos Graduation Program in Pharmaceutical Sciences Islara Rodrigues Cavalcante, Pos Graduation Program in Pharmaceutical Sciences Francisco Osanildo Ferreira Nascimento Adlene Faustino Advíncula Clarissa Maria Gonçalves Machado Romelia Pinheiro Gonçalves Lemes, Professor
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	<p>Introduction</p> <p>Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease that causes important clinical manifestations due to chronic hemolysis and vascular occlusion. Objective: The aim was to report a rare case of univiteline twins diagnosed with SCA, presenting a different clinical characteristic. Methods: An interview with the patients was carried out and the medical records were consulted. Results: One patient has a history of malleolar ulcer in the left lower back, while the other did not. Both patients use hydroxyurea (HU) at the same dosage. Discussion/Conclusion: This study shows that SCA presents, in addition to genetic factors, non-genetic factors involved in the severity of the disease and its clinical manifestations, and studies are needed that contribute to the understanding of the clinical heterogeneity of SCA.</p>
Suggested Reviewers:	Maritza Cavalcante Barbosa, master Universidade Federal do Ceará maritzacavalcante@hotmail.com she knows about the subject
Additional Information:	
Question	Response
If the first author is not a member of the	Marilia Rocha Laurentino

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

----- Forwarded message -----

From: **Editorial Office International Journal of Hematology (IJHM)** <em@editorialmanager.com>

Date: ter, 30 de out de 2018 às 19:10

Subject: IJHM-D-18-00542 : Submission Confirmation for Clinical difference between twins with sickle cell anemia

To: Marília Rocha Laurentino <marilia laurentino@gmail.com>

Submission ID: IJHM-D-18-00542

Dear Dr. Laurentino,

Your submission entitled "Clinical difference between twins with sickle cell anemia" has been received by journal International Journal of Hematology.

This e-mail simply acknowledges receipt of your submission. It does not imply that the paper will be sent out for formal review. Should the editors decide for editorial reasons that the paper is unsuitable for publication in International Journal of Hematology, you will be informed as soon as possible.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://ijhm.editorialmanager.com/>.