



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

JAMILLY LORÊNCIO PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *APEX1*, *POLB*, *RAC1* E *NFKB* EM
PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME**

FORTALEZA

2019

JAMILLY FLORÊNCIO PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *APEX1*, *POLB*, *RAC1* E *NFKB* EM
PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME.**

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

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

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Cordeiro de Sousa.

FORTALEZA

2019

JAMILLY FLORÊNCIO PEREIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES *APEX1*, *POLB*, *RAC1* E *NFKB* EM
PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME.**

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

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Howard Ribeiro Junior Lopes
Universidade da Integração Internacional da lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Profa. Dr^a. Rosangela Pinheiro Gonçalves Machado
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

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)

F654a Florêncio Pereira, Jamilly.
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES APEX1, POLB, RAC1 E NFkB EM PORTADORES DE
ANEMIA FALCIFORME / Jamilly Florêncio Pereira. – 2019.
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Romêlia Pinheiro Gonçalves Lemes .
Coorientação: Profa. Dra. Juliana Cordeiro de Sousa.

1. Anemia Falciforme. 2. Hidroxiuréia. 3. Reparo de excisão de base. I. Título.

CDD 571.9

*À Deus, por tudo que tenho e que sou.
À minha família, que sempre foram meus incentivadores.
Dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, minha mãe Edilania, a minha vó Maria do socorro, a minhas irmãs Juliette, Juliana, Joycilane e minha namorada Priscila Couto pelo apoio em todos momentos da realização desses sonhos.

A minha orientadora Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes pela oportunidade pelos valiosos ensinamentos que certamente acrescentaram muito em minha jornada profissional.

A minha coorientadora Juliana Cordeiro de Sousa pelo apoio técnico em muitas etapas da execução dessa pesquisa.

Aos professores Dr. José Ajax Nogueira Queiroz, Prof. Dr. Howard Ribeiro Junior Lopes, Profa. Dra. Alcínia Braga de Lima Arruda e Profa. Dra. Rosangela Pinheiro Gonçalves Machado pelas valiosas colaborações e sugestões para a melhoria do meu trabalho.

Aos funcionários do HEMOCE e da UFC que sempre ajudaram na execução da pesquisa.

Aos queridos amigos do laboratório de hematologia de hemoglobinopatias de doenças genéticas e hematológicas, Tarcísio Filho, Islara Rodrigues, Yasmine Delles, Pedro Aurio, Renata Eleutério, Luana Leticia, Laís Masullo, Marília Laurentino, Joicelene, Talyta Ellen, Maritza Cavalvante, Anna Thawanny, Mariane, Juliene, Joicelene e Suzzy Dantas pela assistência científica, suporte emocional e bom humor no laboratório de pesquisa.

Aos queridos amigos do mestrado que caminharam comigo essa etapa gratificante da minha vida Leonardo Barbosa, Aline Maia, Patrícia Nunes, Priscila Nunes, John Washington, Gunter Gerson.

A PROAP e a CAPES, pelo apoio financeiro e pela manutenção da bolsa de auxílio.

*“Não venci todas as vezes que lutei,
mas perdi todas as vezes
que deixei de lutar!”*

Cecilia Meireles

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica hereditária caracterizada por uma mutação pontual no gene da beta globina, gerando uma hemoglobina anormal denominada de hemoglobina S (HbS), em homozigose (HbSS). O tratamento consiste no uso contínuo da hidroxiuréia (HU), que aumenta a concentração da hemoglobina Fetal (HbF). Relatos da literatura apontam para um potencial efeito genotóxico da HU, podendo aumentar o risco da instabilidade gênica nesses pacientes. O gene *APEXI* possui diferentes funções, atuando no reparo do dano de fita simples no DNA principalmente induzida pela oxidação e na regulação do estresse oxidativo e de diversos fatores de transcrição via redox. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão dos genes *APEXI*, *POLB*; *NFKB* e *RAC1*, associando a dados laboratoriais, com o tratamento com a HU e com a gravidade da doença em pacientes com AF. Trata-se de um estudo transversal com 98 pacientes adultos com AF, em uso de HU e sem HU, em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e um grupo controle composto por 28 indivíduos saudáveis (HbAA). Os dados epidemiológicos, hematológicos e bioquímicos foram obtidos da análise de prontuários. A expressão dos genes *APEXI*, *POLB*; *RAC1* e *NFKB* foi realizada em sangue periférico, por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando sondas *TaqMan*[®]. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 21, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A idade média dos pacientes foi de 32 (18-32) anos, sendo 59 (60,2%) do sexo feminino e 39 (39,8%) masculino. A HU induziu macrocitose, redução no número de leucócitos e neutrófilos e nos parâmetros de hemólise. Verificou-se achados similares ao se estratificar os pacientes em relação a HbF. Ao analisar a expressão dos genes *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* quanto ao uso ou não da HU observamos uma redução significativa da expressão de *APEXI* e *RAC1* em pacientes que não utilizavam a HU. Pacientes sem uso da HU apresentaram níveis mais baixos da expressão de *RAC1* quando comparados a pacientes tratados com doses de 500mg/dia. Pacientes tratados com maiores doses de HU apresentaram níveis mais elevados de expressão do gene *POLB*. Pacientes com HbF < 15% apresentaram os maiores níveis de expressão do gene *RAC1* e uma maior expressão do gene *NFKB* em Hb $\geq 25\%$. Observou-se que os genes *POLB* e *RAC1* ($p < 0,001$, $R = 0,1760$) e *NFKB* e *POLB* ($p < 0,001$ e $R = 0,1730$) se correlacionaram positivamente e moderadamente em pacientes com AF. Observou-se uma maior expressão dos genes *APEXI* e *POLB* em pacientes com a forma mais graves da doença, o gene *RAC1* foi mais expresso na forma leve e um aumento da expressão do gene *NFKB*, na forma intermediária da doença. Os resultados apontam que os portadores de AF apresentam anormalidade na expressão de genes relacionados ao reparo de excisão de base (BER) *APEXI* e *POLB*, e genes relacionados ao estresse oxidativo e a inflamação como os genes *RAC1* e *NFKB*. Em relação ao uso de HU, o fármaco possivelmente pode estar colaborando para o agravamento da instabilidade genômica na doença. No entanto, estudos mais aprofundados sobre a ação dos referidos genes são necessários para avaliar o seu papel na AF.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Hidroxiuréia. Reparo de excisão de base.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a hereditary hematological disease characterized by a point mutation in the beta globin gene, generating an abnormal hemoglobin called hemoglobin S (HbS), homozygous (HbSS). Treatment consists of continuous use of hydroxyurea (HU), which increases the concentration of Fetal hemoglobin (HbF). Literature reports point to a potential genotoxic effect of UH, which may increase the risk of gene instability in these patients. The APEX1 gene has different functions, acting to repair DNA single strand damage mainly induced by oxidation and regulating oxidative stress and various redox transcription factors. In this context, the aim of the present study was to evaluate the expression of APEX1, POL β ; NF κ β and RAC1, associated with laboratory data, treatment with UH and disease severity in patients with AF. This is a cross-sectional study of 98 adult patients with PA, using HU and without HU, in outpatient follow-up at Walter Cantı́dio University Hospital (HUWC) and a control group of 28 healthy individuals (HbAA). Epidemiological, hematological and biochemical data were obtained from the analysis of medical records. APEX1, POL β gene expression; RAC1 and NF κ β were performed in peripheral blood by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) using TaqMan® probes. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 21 software, with a significance level of 5% ($p < 0.05$). The mean age of the patients was 32 (18-32) years, 59 (60.2%) females and 39 (39.8%) males. UH induced macrocytosis, reduction in leukocyte and neutrophil count and hemolysis parameters. Similar findings were found when stratifying patients in relation to HbF. By analyzing the expression of APEX1 POLB, RAC1 and NFKB genes regarding the use or not of HU, we observed a significant reduction of APEX1 and RAC1 expression in patients who did not use HU. Patients not using UH had lower levels of RAC1 expression when compared to patients treated with doses of 500mg / day. Patients treated with higher doses of HU had higher levels of POLB gene expression. Patients with HbF $< 15\%$ had the highest levels of RAC1 gene expression and higher NFKB gene expression in Hb $\geq 25\%$. The POLB and RAC 1 ($p < 0.001$, $R = 0.1760$) and NFKB and POLB ($p < 0.001$ and $R = 0.1730$) genes correlated positively and moderately in patients with AF. A greater expression of APEX1 and POLB genes was observed in patients with the most severe form of the disease, the RAC1 gene was more expressed in mild form and an increase in NFKB gene expression in the intermediate form of the disease. The results show that AF patients have abnormalities in the expression of genes related to base excision repair (BER) APEX1 and POLB, and genes related to oxidative stress and inflammation such as RAC1 and NFKB genes. Regarding the use of UH, the drug may possibly be contributing to the worsening of genomic instability in the disease. However, further studies on the action of these genes are needed to assess their role in PA.

Key words: Sickle cell anemia. Hydroxyurea. Base excision repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações genéticas em Anemia Falciforme.....	19
Figura 2 - Mapa dos números estimados de nascimentos com anemia falciforme.....	20
Figura 3- Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	21
Figura 4 - Manifestações clínicas na Anemia Falciforme.....	22
Figura 5 - Múltiplos mecanismos de ação da hidroxiuréia na AF.....	24
Figura 6 - Esquema de reparo da via curta de BER.....	27
Figura 7 - Modelos moleculares da função redox de APE1-REF1 como coativador de vários fatores de transcrição.....	28
Figura 8 - Diferença no número de leucócitos e neutrófilos entre pacientes com uso e sem uso de HU.....	41
Figura 9 - Análise da concentração da HbF e HbS entre pacientes com uso e sem uso de HU.....	41
Figura 10 - Expressão (mRNA) de <i>APEX1</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com o uso de HU em relação aos controles.....	44
Figura 11 - Expressão (mRNA) de <i>RAC1</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com o uso de HU.....	44
Figura 12 - Expressão (mRNA) de <i>RAC1</i> de acordo com a dose de HU em pacientes com AF.....	45
Figura 13- Expressão do gene <i>POLB</i> em pacientes com AF de acordo com a dose de HU.....	46
Figura 14 - Expressão (mRNA) de <i>RAC1</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com os níveis de HbF.....	47
Figura 15 - Expressão (mRNA) do <i>NFKB</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a concentração de HbF.....	48
Figura 16 - Análise de correlação entre os genes <i>APEX1</i> , <i>POLB</i> , <i>NFKB</i> e <i>RAC1</i> em pacientes com Anemia Falciforme.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sondas utilizadas na avaliação da expressão (mRNA) por qPCR.....	35
Tabela 2 - Caracterização epidemiológica dos pacientes com Anemia Falciforme (n=98)	37
Tabela 3 - Características dos dados laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme. (n = 98)	38
Tabela 4 - Características hematológico e bioquímico dos pacientes com Anemia Falciforme tratados ou não com HU.....	40
Tabela 5 - Parâmetros hematológicas e bioquímica dos pacientes com Anemia Falciforme de acordo com as classes de HbF.....	42
Tabela 6 - Comparação da expressão (mRNA) de <i>POLB</i> e <i>NFKB</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com o uso ou não de HU e com o grupo controle.....	43
Tabela 7 - Análise de correlação dos genes <i>APEX1</i> , <i>POLB</i> , <i>NFKB</i> e <i>RAC1</i> em pacientes com Anemia Falciforme.....	48
Tabela 8 - Expressão do mRNA de <i>APEX1</i> , <i>POLB</i> , <i>RAC1</i> e <i>NFKB</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a gravidade da doença.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
APE1	Apurínico/Apiridiminico de Endonuclease
<i>APEX1</i>	Apurínico/Apiridiminico de Endonuclease (Gene)
BD	Bilirrubina Direta
BER	Reparo por Excisão de Base
BI	Bilirrubina Indireta
BT	Bilirrubina Total
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
C-Jun	Proteína c-Jun
Cys65	Resíduos de Cisteínas 65
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERG1	Proteína de Resposta ao Crescimento Inicial 1
EROs	Espécies Relativas do Oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
FTs	Fatores Transcricionais
GAPDH	Gliceraldeido fosfati desideogenase
GGT	Gama Glutamil Transferase
GTPase	Guanosina Trifosfatase
HBS	Hemoglobina S
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HIF-1 α	Fator Induzível de Hipóxia 1 Subunidade Alfa
HR	Recombinação Homóloga
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio HUWC
LDH	Lactato Desidrogenase
MMR	Mismatch Repair (Reparo de Pareamentos Errados)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NF κ B	Nuclear Fator Kappa B
NHEJ	Recombinação de Extremidade não Homóloga
POL β	DNA polimerase, beta

p53	Proteína 53
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAC1	Família Rac Pequeno GTPase 1
RAC2	Família Rac pequena GTPase 2
RNA	Ácido Ribonucléico
SOH	Ácido Sulfênico
SSB	Quebras de cadeia simples de DNA
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TGO	Transaminase lutâmico-oxalacética
TRX	Tiorredoxina
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
XRCC1	Proteína 1 de complementação cruzada de reparo de raios X
NO	Óxido Nítrico
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular 1
ICAM- 4	Molécula de Adesão Intracelular 4
FT	Fator de transcrição
ID	Índice de dano
UV	Ultravioleta
LACT	Laboratório de análises clínicas e toxicológicas
LHGDH	Laboratório de pesquisa em hemoglobinopatias e genética das doenças hematológicas
NHEJ	União de extremidade não-homóloga
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
RPM	Rotação por minuto
IMC	Índice de massa corpórea
AVC	Acidente vascular cerebral
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
CFA	Modelo Adjuvante Completo de Freund (CFA)
DBS	Double Strand Breaks

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Anemia Falciforme	18
1.2	Epidemiologia	19
1.3	Fisiopatologia.....	20
1.4	Estresse oxidativo e a AF.....	22
1.5	Hidroxiuréia.....	23
1.6	Mecanismos de reparo de dano ao DNA	25
1.7	<i>APEX1</i> e sua função na via do Reparo de excisão de base (BER).....	25
1.8	<i>APEX1</i> e sua atividade pela via Redox.....	26
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivo específicos	30
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1	Aspectos éticos	31
3.2	Local do estudo	31
3.3	Casuística.....	31
3.4	Seleção da amostra.....	32
3.5	Coleta das amostras e dados.....	32
3.6	Classificação da gravidade da AF.....	32
3.7	Estratificação dos pacientes em relação à dosagem de HbF.....	33
3.8	Expressão do gene <i>APEX1</i> ; <i>POLβ</i> ; <i>RAC1</i> e <i>NFκβ</i> em pacientes com AF e grupo controle.....	33
3.8.1	Processo de lise dos leucócitos.....	33
3.8.2	Extração de RNA total.....	33
3.8.3	Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrometria	34
3.8.4	Síntese de cDNA.....	34
3.9	qPCR (PCR quantitativa em tempo real)	35
3.10	Análise Estatística	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Dados demográficos e laboratoriais.....	37

4.2	Análise da expressão de mRNA de <i>APEXI</i> , <i>POLB</i> , <i>RAC1</i> e <i>NFKB</i> em relação ao tratamento com hidroxiuréia (HU).....	43
4.2.1	Comparação da expressão dos genes relacionados ao uso ou não de HU e o grupo controle.....	43
4.2.2	4.2.2 Expressão (mRNA) de <i>APEXI</i> , <i>POLB</i> , <i>RAC1</i> e <i>NFKB</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a dose de HU.....	46
4.2.3	Expressão (mRNA) de <i>APEXI</i> , <i>POLB</i> , <i>RAC1</i> e <i>NFKB</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com os níveis de HbF.....	46
4.2.4	Análise da expressão (mRNA) de <i>APEXI</i> , <i>POLB</i> , <i>RAC1</i> e <i>NFKB</i> em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a gravidade da doença.....	49
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE A	63
	ANEXO A	64

1 INTRODUÇÃO

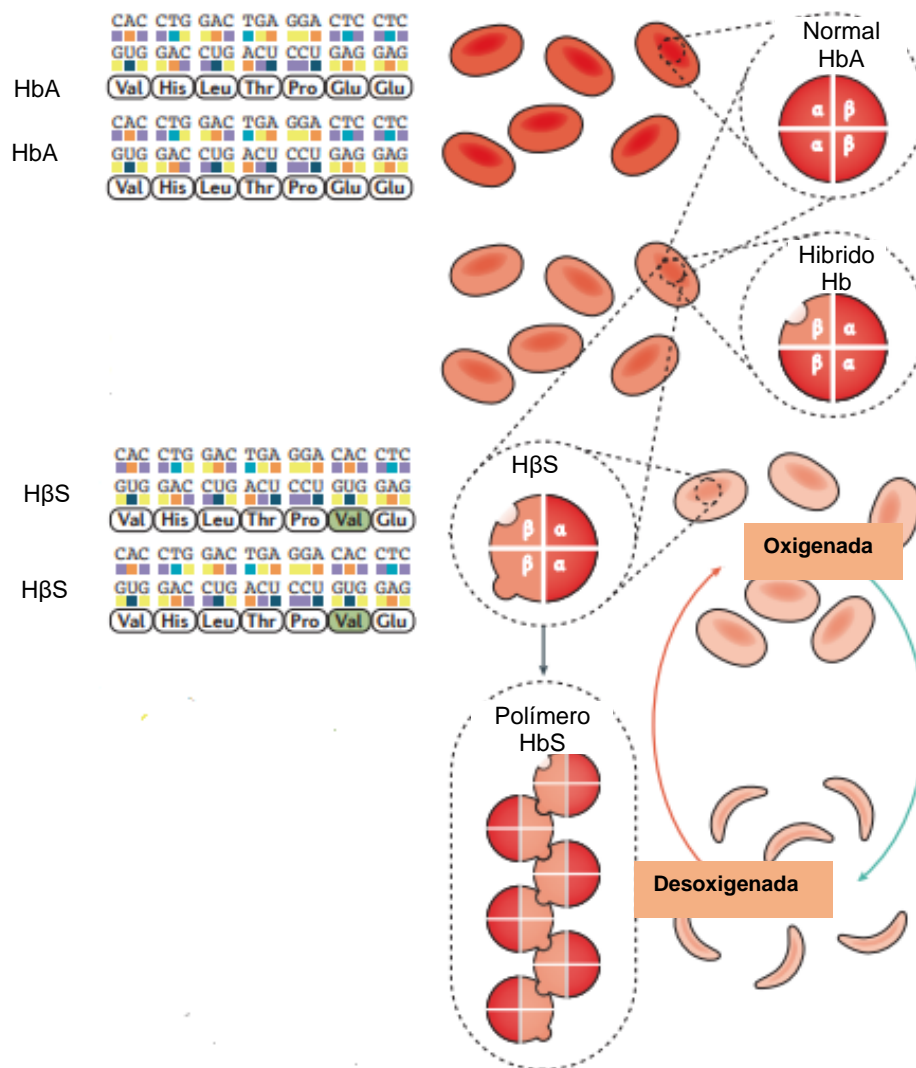
1.1 Anemia Falciforme

A anemia falciforme (AF) é uma doença com uma complexa sintomatologia caracterizada por anemia e crises de dores agudas graves com hospitalizações frequentes, infecções, processos inflamatórios, limitando a expectativa de vida dos pacientes para 36 a 40 anos de idade (LOGGETTO *et al.*, 1999; THEIN, 2017).

A AF é um da doença monogênica causada por um único ponto de mutação gerada por uma mudança de base, da adenina para a timina localizado na posição genômica -69-70-71-bp (uma posição correspondente ao 6º codon) do gene da cadeia β A (*localização citogenética: 11p15.4; coordenadas genômica (GRCh38): 11:5,225,465-5,227,070*) (RODWELL, 2000; L2014ONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001). A doença se caracteriza por uma herança autossômica recessiva, na qual os pacientes herdam uma cópia mutada do gene da β -globina de cada genitor. Os pais geralmente carregam um gene da β -globina tipo selvagem e um gene mutante que resulta em uma hemoglobina falciforme (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000).

A diferença estrutural entre hemoglobina normal adulta e hemoglobina falciforme (HbS) é a substituição do ácido glutâmico por valina na cadeia de aminoácidos da β -globina (STUART; NAGEL; 2004). Resultante da alteração na mutação do DNA é a produção de uma hemoglobina anômala, a HbS. As consequências dessa substituição do aminoácido só se tornam aparentes quando o oxigênio se dissocia da hemoglobina. Em estado de hipóxia, a HbS desoxigenada altera a conformação de tal forma que a valina exposta adere a região hidrofóbica de uma molécula de hemoglobina vizinha. Isso leva ao empilhamento da hemoglobina em polímeros longos que deformam a membrana celular do eritrócito para uma forma rígida em forma de “foice”. As hemácias distorcidas retomam uma forma normal nos pulmões quando o oxigênio mais uma vez se liga à hemoglobina. Ao longo do tempo, no entanto, essas transições levam a distorções irreversíveis da membrana eritrocitária (FIGURA 1) (STUART; NAGEL, 2004; PIEL; STEINBERG; REES, 2017; KATO *et al.*, 2018).

Figura 1 – Alterações genéticas em Anemia Falciforme.



Nota: A hemoglobina normal A (HbA) é formada por duas subunidades α -globina e dois subunidades de β -globina, Alelo da HbS, β^S , é um alelo em que a uma substituição adenina-timina resulta na substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 na cadeia β -globina. A Anemia falciforme ocorre quando ambos os alelos hemoglobina subunidade β estão mutados pelo β^S . Em baixas concentrações de oxigênio, as hemácias HbSS adquirem uma forma de “foice” sendo as principais responsáveis pela grande maioria das complicações clínicas da doença. Fonte: Adaptada de Kato *et al.*, (2018).

1.2 Epidemiologia

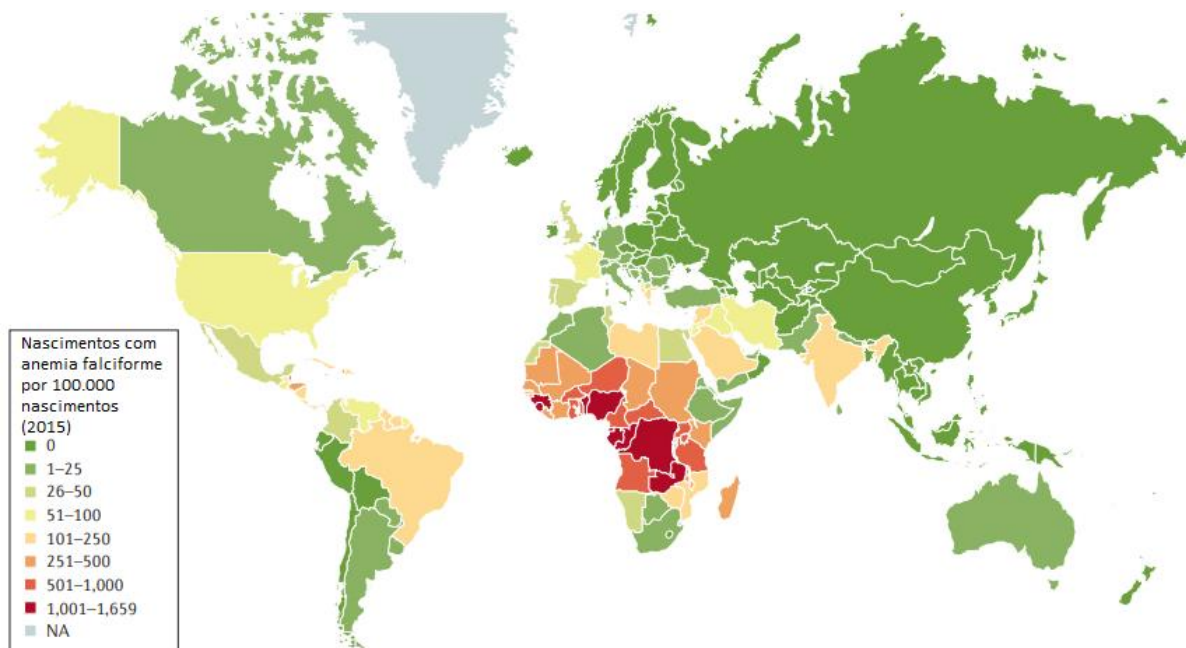
O gene β^S que é referente a uma mutação pontual, que dá origem a HbS, é amplamente distribuído em todo o mundo, sendo encontrado em torno do Mediterrâneo na Sicília, partes do sul da Itália, na Grécia, Turquia, Arábia Saudita, Irã, na Índia central e em grande parte da África (SERJEANT, 1997).

Na África sub-saariana foi estimado uma incidência de nascimentos com Anemia Falciforme (HbSS) de 230.000 casos em 2010, o que corresponde a 75% dos nascimentos com HbSS no mundo (PIEL *et al.*, 2017). A figura 2 demonstra a estimativa de recém-nascido

com AF no mundo (KATO *et al.*, 2018).

No Brasil a incidência de HbS oscila entre os estados, refletindo a heterogeneidade étnica da população. Em 2014, a ocorrência foi de 1 em 650 recém-nascidos no estado da Bahia, 1 em 1.300 no estado do Rio de Janeiro e 1 em 13.500 no estado de Santa Catarina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Figura 2 – Mapa dos números estimados de nascimentos com Anemia Falciforme.



Nota: Números estimados de nascimentos com Anemia Falciforme por 100.000 nascimentos por país em 2015. Fonte: Adaptada de Kato *et al.*, (2018).

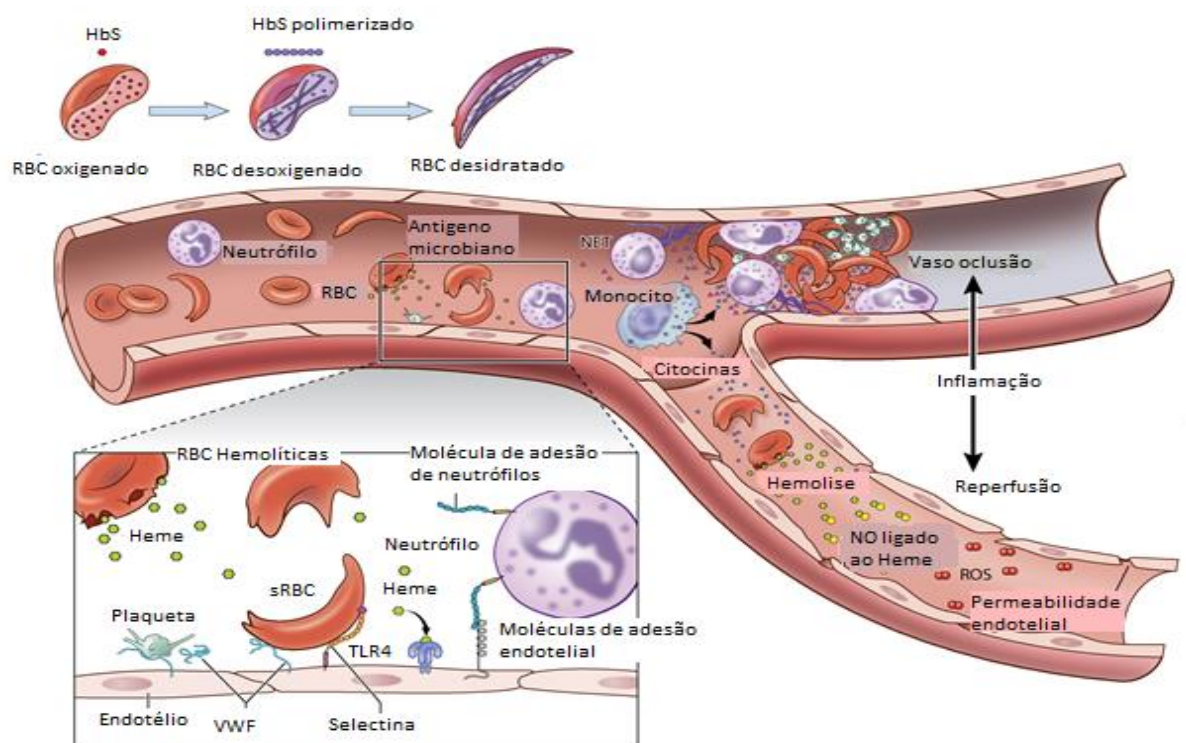
1.3 Fisiopatologia

A HbS em homozigose polimeriza em baixas tensões de oxigênio, a molécula de HbS torna-se tensa e as globinas beta S ficam mais próximas, favorecendo o contato entre as regiões da desoxi-Hb, o que não é possível no estado oxigenado, essa proximidade forma os polímeros de HbS, com várias moléculas agregadas, que se precipitam no citoplasma, modificando assim a conformidade do eritrócito que deixa de ter a forma bicôncava e apresenta a forma de “foice”, que é mais rígida e perde a flexibilidade ao passar pelos pequenos capilares, aumentando assim a obstrução do vaso (vaso-oclusão) e os eventos de hemólise (STYPULKOWSKI; MANFREDINI, 2010; PIEL *et al.*, 2017).

O processo de hemólise na AF acarreta disfunção endotelial, vasculopatia, hipercoagulabilidade e ativa processos inflamatórios. O NO é produzido pelo endotélio e regula o tônus vasodilatador basal, inibe a ativação plaquetária e hemostática, inibe a expressão

transcricional de moléculas de adesão, como a VCAM-1, e dificulta a ligação entre as células, normalizando a função vascular. As células em “foice” são muito frágeis e possuem uma meia vida reduzida em 75%, quando a membrana eritrocitária é rompida libera polímeros de Hb, polímeros esses que podem prejudicar os níveis de óxido nítrico (NO). A eliminação de NO favorece a adesão intercelular e a vaso-oclusão, além disso esse processo hemolítico também contribui no aumento de arginase que reduz a arginina, assim diminuindo ainda mais os níveis de NO. A liberação de reticulócitos que são muito ricos em moléculas de adesão, como VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), CD36 e molécula de adesão intercelular - 1 (ICAM - 4). Os níveis diminuídos de NO favorecem na ativação plaquetária, plaquetas ativadas expressam e liberam E-selectina, ICAM-1, solúvel e P-selectina, este último leva a expressão do fator tecidual (TF). Moléculas como P - selectina e E - selectina beneficiam a adesão de leucócitos e a adesão leucocitária - endotélio, contribuindo ainda mais para os processos vaso oclusivos na doença. (KATO *et al.*, 2009; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2018; WILLIAMS; THOMAS; SWEE, 2018; PICCIN *et al.*, 2019).

Figura 3 – Fisiopatologia da Anemia Falciforme.

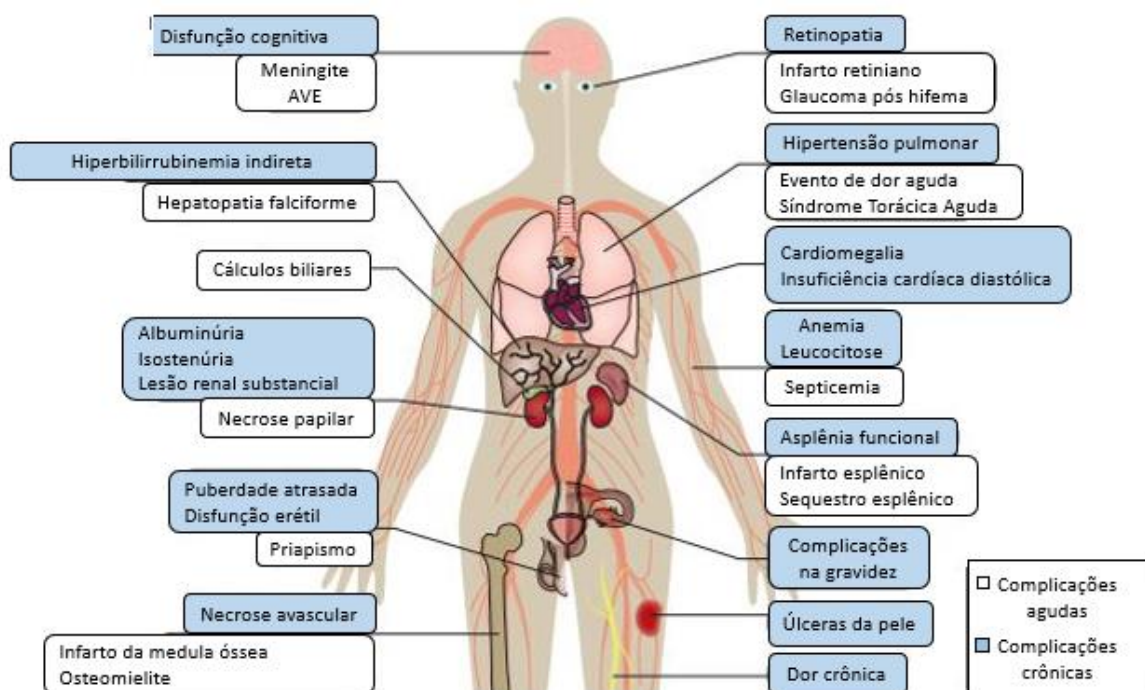


Nota: Fisiopatologia, estímulos inflamatórios e interações celulares na AF. A polimerização da deoxi-HbS eventualmente leva a formação de eritrócitos em forma de “foice”. As células falciformes desencadeiam a oclusão microvascular ao interagir com neutrófilos e plaquetas ativadas e adesão ao endotélio vascular, levando a isquemia e hipóxia a restauração do fluxo pode causar lesão de reperusão. Os eritrócitos deformados tem uma curta duração, liberando continuamente hemoglobina, e hemoglobina oxidada libera heme. A heme funciona

como um padrão molecular associado a danos que ativa as células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de NETs (NETosis) via ligação TLR4. Legenda: HbS, hemoglobina S; NET, armadilha extracelular de neutrófilos; NO, óxido nítrico; RBC, glóbulos vermelhos; EROs, espécies reativas de oxigênio; SCA, anemia falciforme; sRBC, glóbulos vermelhos falciformes; VWF, fator von Willebrand. Fonte: THOMAS N. WILLIAMS, AND SWEE LAY THEIN, 2018.

As manifestações clínicas nesta doença são heterogêneas, apresentam diferentes níveis de complexidades, afetando diversos sistemas do corpo do paciente, podendo se manifestar de forma aguda ou crônicas como descrito por Pecker e Little, 2017 e Kato *et al.*, 2018 (Figura 4).

Figura 4: Manifestações clínicas na Anemia Falciforme.



Nota: Principais complicações clínicas da Anemia Falciforme. Complicações agudas trazem ao indivíduo uma atenção médica imediata; a dor é a complicação aguda mais comum. Os indivíduos com complicações crônicas apresentam disfunções orgânicas que podem contribuir para a morte prematura. Complicações da gravidez incluem pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, parto prematuro e mortalidade perinatal. Fonte: Adaptada de Kato *et al.*, 2018.

1.4 Estresse oxidativo e a AF

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ter origem exógenas, através da luz ultravioleta (UV), UVA e UVB, radiação ionizante e agentes químicos. Sua origem também pode ser endógena através do metabolismo celular ou através de processos

patológicos como inflamações e aumento de estresse oxidativo. As EROs podem causar danos no DNA, nos lipídeos, nas proteínas e açúcares, entretanto, os danos a nível de DNA são mais complexos, uma vez que, os danos nas outras macromoléculas podem ser degradados e removidos caso danificados, o que nem sempre ocorre com a molécula de DNA. (BERRA; MENCK, 2006).

A hemólise crônica, a ativação de células endoteliais vasculares e a vaso-oclusão são as principais características da doença, outro fator que pode agravar ainda mais na AF é a lesão de reperfusão de isquemia que é caracterizada pela interrupção intermitente do vaso, seguida da restauração do fluxo sanguíneo, este processo de reestabelecimento do fluxo sanguíneo está relacionado com a produção de espécies reativas (EROS), evento que contribui para o aumento do estresse oxidativo na doença (WOOD; GRANGER., 2007; ALAYASH, 2018).

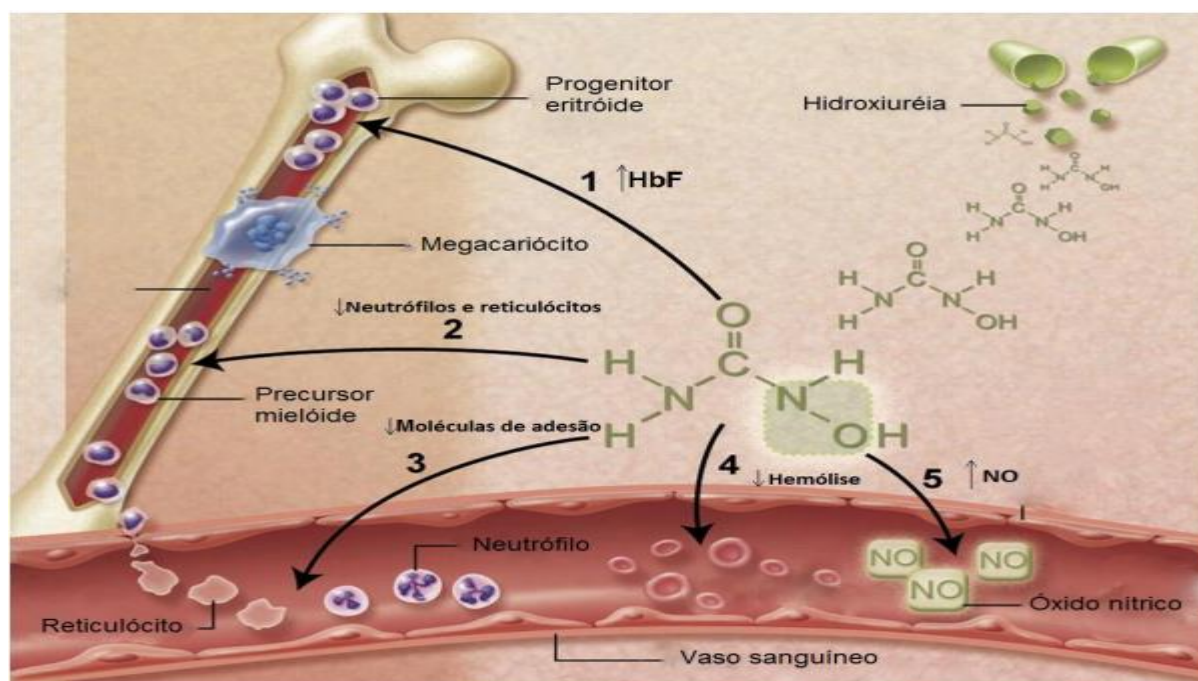
1.5 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU) é o único medicamento aprovado pelo *Food and Drug Administration* para tratamento da AF. O principal benefício da HU é a elevação da concentração da hemoglobina fetal (HbF), com consequente redução da expressão de moléculas de adesão e mediadores inflamatórios, diminuindo assim os processos de vaso-oclusão (WILLIAMS; THEIN, 2018).

A HU inibi a enzima ribonucleoside difosfato redutase, enzima esta que converte ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos (dNTPs), esgotando o *pool* de dNTP intracelular, a HU atua na fase S do ciclo celular parando a divisão celular, atuando como um mielosupressor, com ação citoredutora, citotóxico e anti-neoplásico. (KOÇ *et al.*, 2004; HANFT *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2003; WARE., 2010).

A HU está relacionada ao aumento da HbF nos eritrócitos, diminuição de processos de falcização, levando à melhora da clínica dos pacientes e a redução do número de hospitalizações, entretanto apesar dos seus benefícios, o seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. (FIGURA 5) (STUART; NAGEL, 2004; COKIC, 2007; WONG, 2014; DA GUARDA, 2016).

Figura 5 - Múltiplos mecanismos de ação da hidroxiuréia na AF.



Nota: Múltiplos mecanismos de ação por hidroxiuréia para SCA. (1) Indução de hemoglobina fetal através de guanilina solúvel ativação da ciclase e cinética eritróide alterada; (2) menor contagem de neutrófilos e reticulócitos da ribonucleotídeo redutase inibição e citotoxicidade da medula; (3) diminuição da adesividade e melhor reologia dos neutrófilos circulantes e reticulócitos; (4) hemólise reduzida através da melhoria da hidratação dos eritrócitos, macrocitose e redução da falcização intracelular; e (5) liberação de óxido nítrico (NO) com potencial vasodilatação local e melhora da resposta vascular. Fonte: Imagem de McGann & Ware (2015).

Embora apresente muitos benefícios para o paciente com AF, a HU também demonstra algumas desvantagens. Sakano *et al.* (2001) sugerem que este quimioterápico induz à oxidação de base do DNA, conferindo, desse modo, um potencial aumento da instabilidade genômica e assim provocando um risco aumentado de desenvolver neoplasias.

Estudo relata uma associação do uso prolongado da HU ao aumento do dano do DNA em pacientes com AF podendo levar a um risco aumentado para a malignidades hematológica nesses pacientes, principalmente para o surgimento de leucemias (BRUNSON *et al.*, 2017).

A literatura tem demonstrado que, pacientes com AF tratados com HU apresentam maiores níveis de dano no DNA quando comparado com indivíduos saudáveis. Esse dano no DNA mostrou ser maior em pacientes que utilizavam doses elevadas e que tinham um maior tempo de utilização deste medicamento, indicando, desse modo, que a HU apresenta um potencial genotóxico (ROCHA *et al.*, 2012).

Estudo publicado por nosso grupo de pesquisa tem demonstrando os possíveis efeitos deletérios da HU. Pedrosa *et al.*, (2014), ao avaliar o índice de danos (ID) em neutrófilos isolados de pacientes com AF tratados ou não com HU, evidenciaram que o grupo

tratado com HU apresentou valores ID significativamente maiores quando comparado ao grupo controle e ao grupo de pacientes AF não tratados, demonstrando que o HU aumenta os riscos de dano ao DNA.

1.6 Mecanismos de reparo de dano ao DNA

As quebras de fitas duplas (“*Double Strand Breaks*” – DBS) são danos que rompem a dupla fita de DNA, tais danos são reparados por dois tipos de mecanismos de reparos diferentes. O primeiro deles conhecido como reparo por recombinação homóloga (HR) obtém informações de cromossomos homólogos para reparar o DNA duplamente quebrado, o segundo mecanismo é o reparo por junções de extremidades não homólogas (NHEJ) no qual o reparo é realizado pela união aleatória de qualquer extremidade do DNA (KHANNA; JACKSON, 2001).

Além dos reparos de danos de fita duplas, existem outros mecanismos de reparo que irão corrigir as quebras nas fitas simples no DNA (DSS) gerados pela exposição a agentes cancerígenos, tais como a luz ultravioleta, EROs e estresse oxidativo. Existem três tipos de reparos que requerem funções diferentes e irão corrigir as alterações ocasionadas aos nucleotídeos: reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que consiste na retirada dos nucleotídeos danificados em blocos e adiciona novos nucleotídeo que serão alocados no ponto onde ocorreram o dano ao DNA (MARTEIJN *et al.*, 2014). Reparo por excisão de bases (BER), que remove a base defeituosa por um processo de clivagem da ligação da base nitrogenada (desoxirribose), seguida pelo preenchimento da base correta por ação da DNA polimerase (KROKAN; BJORAS, 2013). E por fim, o reparo de incompatibilidade de DNA (MMR); que é responsável pela correção de erros realizados na replicação do DNA e na recombinação de genes que resultam em um mau pareamento dos nucleotídeos. É uma via biológica altamente conservada que desempenha um papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica, reparando erros de correspondência de base-base e de inserção / deleção gerados durante a replicação e recombinação do DNA (GOU-MIN LI, 2008).

1.7 APEXI e sua função na via do Reparo de excisão de base (BER)

As EROs são geradas pela célula no seu processo metabólico normal, porém a produção desses EROs não deve exceder a capacidade antioxidante celular, pois pode ocasionar o aumento do estresse oxidativo podendo comprometer a integridade do material genético, causando danos oxidativos, levando a um aumento do potencial de mutações

genômicas. O reparo por excisão de base (BER) é encarregado de realizar o reparo das lesões de DNA geradas pela oxidação e perda de base espontânea (WHITAKER *et al.*, 2017).

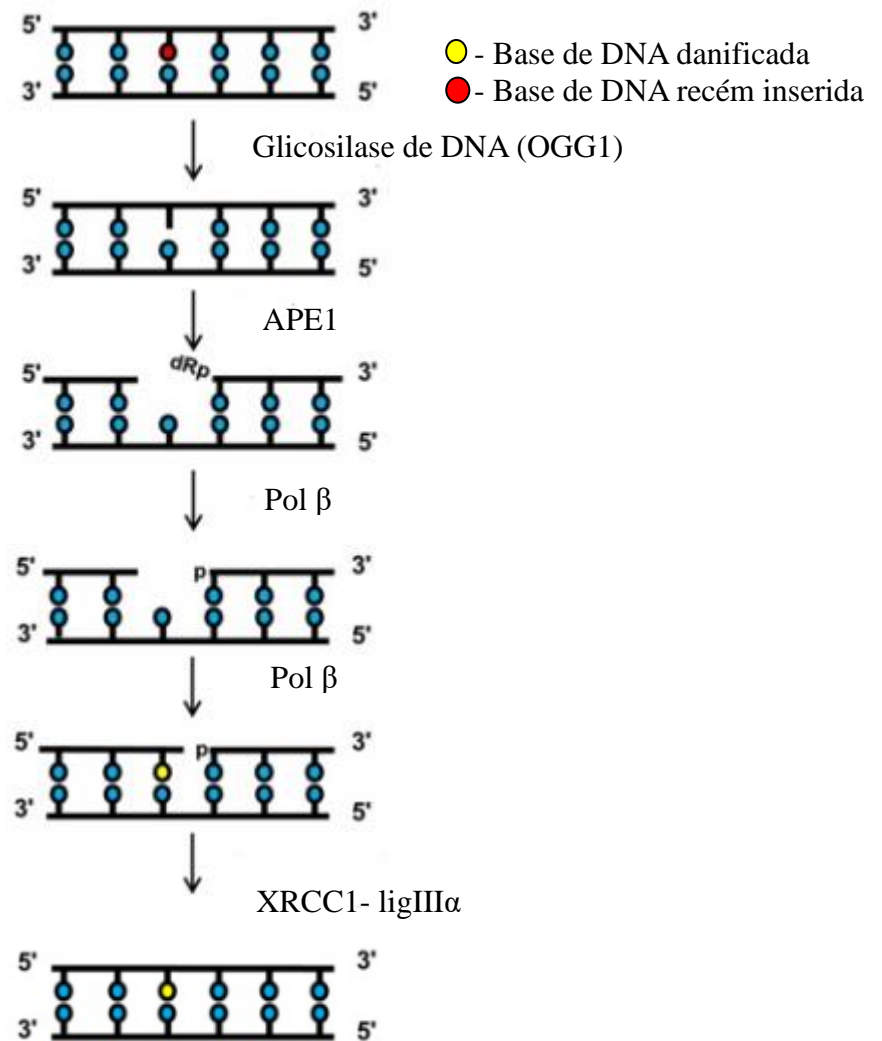
O BER é o mecanismo mais utilizado para corrigir danos de fita simples do DNA ocasionados principalmente por EROs gerados pelo processo de estresse oxidativo. A via do BER, é um mecanismo de reparo coordenado por um grupo de enzimas. Uma glicosilase de DNA é capaz de realizar a excisão de uma base modificada específica resultando em um sítio abásico. A enzima apurínico/apirimidínico endonuclease (APE1) reconhece este sítio e cliva a ligação 5'-fosfodiéster, gerando as extremidades 3'OH e 5'dRP. A DNA polimerase β (pol β) reconhece as extremidades modificadas pela APE1 e inicia a correção da falha com a inserção de nucleotídeos no local abásico. Finalmente, são recrutados para realizar a ligação dos nucleotídeos as enzimas DNA ligases I e III e XRCC1 (FIGURA 6) (HEGDE *et al.*, 2008; TELL *et al.*, 2009; NICKSON.; PARSON, 2014; DI MASI, 2017).

Um dos genes envolvidos no reparo de fita simples é o gene *APEX1*, que codifica a proteína APE1. O *APEX1* possui funções distintas atuando no reparo de danos de fita simples do DNA e na via redox. Sua função redox está associada a regulação de fatores de transcrição, podendo ter ação direta na transcrição de muitos genes, tais como o NF- κ B, ERG1, Tp53, HIF-1 α . Por esta via redox, este gene pode atuar inibindo a GTPase RAC1, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo (DEMPLE *et al.*, 1994; MICHITAKA *et al.*, 2002; BHAKAT *et al.* 2009; LI *et al.*, 2014).

1.8 *APEX1* e sua atividade pela via Redox

O *APEX1* é um gene que codifica a proteína APE1/Ref-1, a qual possui função dupla, estando envolvida tanto nas vias de reparo BER de lesões de DNA, como também na função redox. A estrutura molecular da proteína APE1 determina sua função. A extremidade C-terminal está associada a função AP-endonuclease com ação no reparo do DNA e a extremidade N-terminal (Cys65) da proteína está associada à sua função redox. Essas distintas funções da APE1 são completamente independentes. Na via redox, que regula os fatores de transcrição (FTs), tais como: Egr-1, NF- κ B, p53, AP-1, HIF-1 α , STAT3. O aumento da expressão desta função redox da APE1 está relacionada a um aumento de crescimento celular, aumento da migração e da resistência a quimioterápicos, e assim, pode conferir um pior prognóstico do paciente com câncer (SHAH *et al.*, 2017).

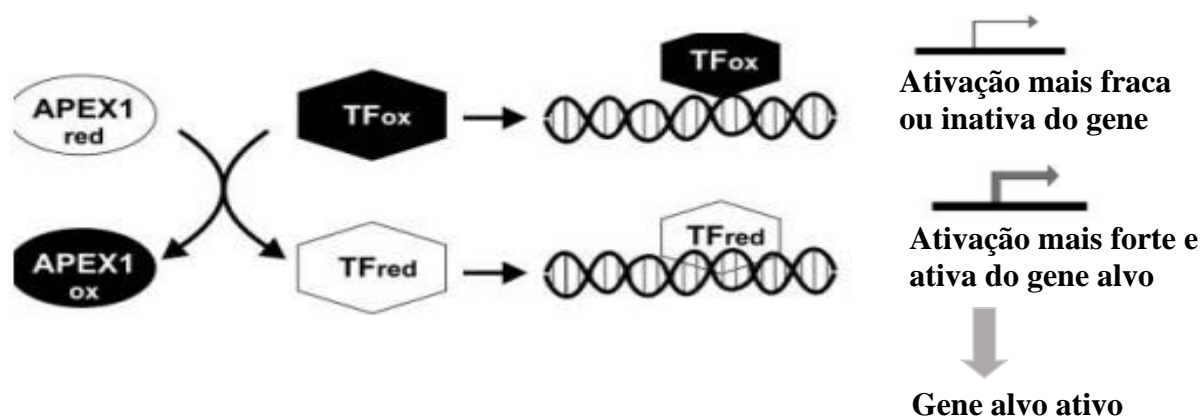
Figura 6 – Esquema de reparo da via curta de BER



Nota: O reparo por excisão de base (BER) é iniciada por uma DNA Glicosilase específica (OGG1) que reconhece e excita a base danificada para criar um sítio abásico, que é então incisado por APE1 que reconhece esses sítios abásicos e cria um DNA SSB flanqueado por extremidade 3'-hidroxil e 5'-dRP. Pol β cliva a porção 5'-dRP e simultaneamente adiciona um único nucleotídeo correto na lacuna. Finalmente as extremidades do DNA SSB são seladas pelo complexo XRCC1-lig IIIα que completam a correção da via BER. Fonte: Di Masi, (2017).

A via redox da APE1/Ref-1 regula a atividade de ligação desses FTs ao DNA. Para que a via redox seja efetivamente ativa acontece um processo de oxido redução, e juntamente com a Tiorredoxina que é reduzida para Tiorredoxina redutase, auxilia assim na redução e ativação de fatores de transcrição, agindo principalmente no núcleo das células endoteliais humanas, fazendo com que esses FT se liguem a regiões gênicas específicas (FIGURA- 7) (TELL *et al.*, 2009; LUKOSZ *et al.*, 2010; THAKUR *et al.*, 2014).

Figura 7 – Modelos moleculares da função redox de APE1-REF1 como coativador de vários fatores de transcrição.



Nota: Modelo molecular da função redox de APE1 como coativador de vários fatores de transcrição, converte fatores de transcrição (FT), de um estado oxidado inativo para um reduzido ativo, podendo assim se ligar a regiões regulatórias de genes alvos. A tioredoxina (TRX) é responsável para completar o ciclo redox pelo qual a forma reduzida de APE1 é restaurada. Fonte: figura adaptada de Lukosz, *et al*, 2010.

Hye-mi Lee *et al.*, (2009) relataram que APE1 foi essencial para a ativação transcricional do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1 α) e o fator nuclear kappa β (NF- κ B), ambos cruciais na indução inflamatória em testes realizados em queratinócitos psoríaticos, agindo, assim, como um modulador da resposta inflamatória.

Ozaki *et al.*, (2002) ao avaliarem a expressão de APE1 no fígado de camundongo *in vivo* e isolado de hepatócitos relataram que a APE1 pela sua via redox Ref-1 foi capaz de inibir a atividade GTPase Rac1 e diminuir o estresse oxidativo induzido pela re-oxigenação / re-perfusão, suprimindo a atividade da NF κ β e lesão tecidual oxidativa, atuando, assim, como uma proteção contra a lesão oxidativa.

Células mais expostas a EROs mostraram um aumento significativo na resistência à citotoxicidade, demonstrando que uma “resposta adaptativa” parece resultar do reparo aprimorado de lesões de DNA citotóxico devido a uma atividade aumentada de APE-1 (RAMANA *et al.*, 1998).

O complexo NADPH oxidase consiste de um componente de membrana que compreende duas subunidades, gp91phox e p22phox, e vários componentes citosólicos incluindo p40phox, p47phox, p67phox e a pequena GTPase Rac (Rac1 ou Rac2). Evidências relatam que a NADPH oxidase tem como principal atividade a geração de EROs. Relatos também indicam que várias moléculas podem interagir com esse complexo NADPH oxidase e

o *APEXI* tem sua participação na inibição da NADPH oxidase e redução de EROs (Gerco *et al.*, 2016).

George *et al.* (2013) demonstraram que a produção de EROs em células falciformes é mediada enzimaticamente pela NADPH oxidase que é regulada pela RAC1 no interior do eritrócito falciforme. O grupo conclui que o processo fisiopatológico da AF, como a hemólise, a vaso-oclusão e o processo inflamatório crônico ocasionados pelos danos teciduais podem originar um ciclo de geração de EROs.

A AF apresenta um processo inflamatório crônico associado a um aumento na geração de EROs, hemólise, ativação endotelial, e possíveis danos oxidativos no DNA (ALAYASH, 2018). Destaca-se que estudos do nosso grupo demonstram um aumento no índice de dano (ID pela técnica do cometa) e instabilidade genômica, pelo micronúcleo em pacientes com AF em uso crônico com HU (MAIA FILHO *et al.*, 2018). Porém um outro estudo do mesmo grupo avaliou a instabilidade genômica por citogenética em pacientes com AF com elevado ID no DNA e não detectou alterações cromossômicas (ROCHA *et al.*, 2012).

Diante deste contexto, o presente estudo propôs-se a investigar a influência da expressão do gene *APEXI* que possui funções distintas tanto no reparo de dano de fita simples do DNA, como função redox (regulação transcricional) e sua influência na regulação da expressão dos genes *PolB*, *NFκβ* e *RAC1* em pacientes com AF, bem como avaliar se a terapia com a HU influencia na expressão dos genes acima e suas possíveis modulações nas manifestações clínicas da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão dos genes *APEX1*, *Polβ*, *NFκβ*; e *RAC1* em pacientes com AF.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil da população em estudo quanto a idade, sexo, origem, peso, altura, IMC, Pressão sistólica e diastólica. Tempo de diagnóstico, parâmetros hematológicos (hemácia, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, HbS, HbF, HbA2, reticulócitos) e bioquímicos (ureia, creatinina, LDH, Ácido úrico, BT, BD, BI, TGO, TGP, GGT, FAL, Ferro, Ferritina).
- Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos em pacientes AF em relação ao uso ou não de HU.
- Avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes com AF de acordo com os níveis de HbF.
- Analisar a expressão dos genes *APEX1*, *POLB*, *NFKβ* e *RAC1* em pacientes com Anemia Falciforme (HbSS) e em indivíduos saudáveis do grupo controle (HbAA) quanto ao uso ou não de HU e a dose do fármaco utilizada (15-25 mg/kg/dia).
- Associar a expressão dos genes *APEX1*; *POLβ*; *RAC1* e *NFKβ* em pacientes com AF, com os níveis de HbF.
- Avaliar a correlação entre os genes *APEX1*; *POLβ*; *RAC1* e *NFKβ* na AF.
- Associar a expressão dos genes *APEX1*; *POLβ*; *RAC1* e *NFKβ* com diferentes níveis de gravidade da doença.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o número de parecer; 3.089.093, e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), após concordarem em participar do estudo.

3.2 Local do Estudo

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) e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). A coleta das amostras dos indivíduos saudáveis para compor o grupo controle (HbAA) foi realizada no HEMOCE. O período das coletas foi de julho de 2018 até o mês de novembro de 2018.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH), do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), onde foram realizados todos os testes moleculares.

3.3 Casuística

Trata-se de um estudo transversal analítico, no qual foram selecionados aleatoriamente pacientes portadores de AF no Ambulatório do HUWC. Participaram do estudo 98 pacientes com diagnóstico de AF acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídio. Essa amostragem corresponde a aproximadamente 83% dos pacientes com cadastro ativo na referida instituição.

Os pacientes com AF (n=98) foram estratificados quanto ao tratamento com HU: grupo HbSS (pacientes não tratados com HU, n= 30), pacientes com mais de doze meses sem utilizar o HU e grupo HbSSHU (pacientes tratados com HU nas doses de 15 a 25 mg/kg/dia, n=68).

Um grupo controle (HbAA) (n=28) foi formado por indivíduos doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), de

ambos os sexos.

3.4 Seleção da amostra

Critérios de inclusão

- Grupo AF: Pacientes adultos com diagnóstico de anemia falciforme confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography - HPLC) em uso ou não de HU que aceitaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- Grupo controle; indivíduos doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), de ambos os sexos que aceitaram participar e assinaram o termo do TCLE.

Critérios de exclusão

- Pacientes com outras hemoglobinopatias após a análise do prontuário;
- Pacientes que realizaram transfusões há menos de 90 dias no dia da coleta;
- Pacientes em período gestacional.

3.5 Coleta das amostras e dados

Todas as amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA para a obtenção do pool de células para a extração do material genético e expressão dos genes *APEX1*; *POLβ*; *RAC1* e *NFκβ* em pacientes portadores de Anemia Falciforme e do grupo controle. Posteriormente, foi realizada a avaliação dos prontuários para traçar as características epidemiológicas, hematológicas e bioquímicas. Os dados foram obtidos em prontuários de pacientes com AF no mesmo período da coleta de sangue periférico.

3.6 Classificação da gravidade da AF

Nós usamos a ferramenta "Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme", disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>, para o cálculo dos escores de gravidade e classificação dos pacientes em categorias por fenótipo (leve, intermediária, grave). Esta ferramenta foi desenvolvida por meio de modelagem de rede Bayesiana usando 25 variáveis clínicas e laboratoriais para estimar a gravidade da doença falciforme em um estudo

que acompanhou 3.380 pacientes. O modelo de rede calcula o risco de morte dentro de cinco anos e considera este risco como um escore de gravidade da doença, que varia de 0 (menos grave) a 1 (mais grave). O valor preditivo é feito com base em um perfil clínico e laboratorial do modelo foi validado em dois conjuntos independentes de pacientes e mostrou alta especificidade e sensibilidade (SEBASTIANI et al., 2007). Os escores de gravidade calculados para este estudo incluiu as variáveis exigidas pela calculadora: idade, síndrome torácica aguda (STA), níveis de bilirrubina total, transfusão de sangue, níveis de lactato desidrogenase (LDH), volume corpuscular médio (VCM), crises de dor, priapismo, reticulócitos absoluto, gênero, acidente vascular encefálico (AVE), leucócitos totais, genótipo da doença falciforme e necrose avascular óssea.

3.7 Estratificação dos pacientes em relação à dosagem de HbF

Nós estratificamos os pacientes com AF de acordo com os níveis de HbF que foi categorizado em 3 grupos $\leq 15\%$, $15-25\%$ e $\geq 25\%$, a concentração de HbF foi estimada a partir da HPLC, esta informação foi retirada previamente dos prontuários dos pacientes, utilizamos o mesmo modelo de categorização de HbF empregado por Jit et al., 2019.

3.8 Expressão do gene *APEX1*; *POLβ*; *RAC1* e *NFκβ* em pacientes com AF e grupo controle.

3.8.1 Processo de lise dos leucócitos

Foi realizada a centrifugação das amostras em tubos de EDTA a 4000rpm durante 10 minutos para resgatar o *pellet* leucocitário e transferi-lo para um tubo do tipo Falcon de 50 mL o qual foi lavado com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M), homogeneizado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi despreza a fase aquosa e acrescenta 250μL de PBS e 750μL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen, EUA), posteriormente o material foi homogeneizando com pipeta até total dissolução. Após este procedimento, essa amostra lisada foi devidamente armazenada no freezer a -80°C para posterior extração do RNA total.

3.8.2 Extração de RNA total

A) Fase de separação do RNA:

O RNA extraído de leucócitos do sangue periférico dos pacientes com AF e dos indivíduos do grupo controle a partir da utilização do Trizol LS Reagente®, foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada amostra coletada e armazenada em 1mL de Trizol Reagente® foi adicionado 200µL de Clorofórmio para desproteinização e 10µL de glicogênio, as amostras foram vortexadas e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4° C e retirada do sobrenadante de cada amostra evitando a interfase.

B) Fase de precipitação do RNA:

O material restante foi transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol, homogeneizou-se e incubou-se por 60 minutos ou *overnight* a -20°C.

C) Fase de lavagens:

Passado o período da precipitação realizou-se outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão cuidadosamente. O pellet formado foi ressuspenso em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos.

D) Dissolução do RNA

Desprezou-se novamente o sobrenadante por inversão e preservando o precipitado deixou-se secar o tubo (invertido) durante 10 a 15 minutos, após totalmente seco, o pellet foi diluído com 17 µL de água livre de RNase.

3.8.3 Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras de RNA por espectrometria

Realizamos leituras no espectrofotômetro NanoDrop ND-100 para determinar a concentração e a qualidade do RNA total. Para determinar a pureza das amostras utilizamos razão de ondas de 260 e 280 nm, onde consideramos as amostras com a melhor qualidade de ácidos nucleicos aquelas que apresentaram um padrão de razão A260/A280 entre 1.8 e 2.0.

3.8.4 Síntese de cDNA

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), foi utilizada 2000ng de cada amostra, para realizar a síntese do cDNA utilizamos o Kit para Transcrição Reversa da Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído cinco vezes para a ser utilizado nas reações de qPCR e armazenado a -20°C.

3.9 qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

Para as realizações das reações foi utilizado o aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) onde quantificamos a expressão genica dos 6 genes (*APEX1*; *POLβ*; *RAC1* e *NFκβ*) e do gene endógeno (*GPDH*) de acordo com a tabela1, em placas transparentes de 96 poços (MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando sondas TaqMan assay® com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems. O volume final de cada reação foi de 10μl, sendo 7μl de TaqMan Universal, 0,5μl de primer (TaqMan Assay) e 2,5μl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

Tabela 1 – Sondas utilizadas na avaliação da expressão (mRNA) por qPCR

GENES ESTUDADOS	CÓDIGOS DE REFERÊNCIA (applied Biosystems)
Gene Normalizador	
<i>GAPDH</i> (Gliceraldeido fosfati desideogenase)	Hs02786624g1
Genes de Estudo	
<i>APEX1</i> (Apurinérgica / Apirimidinica / Enduroxirribonuclease)	HS00172396_ml
<i>POLβ</i> (Polymerase beta)	Hs01099715_ml
<i>NF-KB</i> (<i>RELA</i>) (factor nuclear kappa B)	Hs00968440_ml
<i>RAC1</i> (Família Rac Pequeno GTPase 1)	Hs00251654_ml

Nota: Sondas estudadas na pesquisa da avaliação da expressão genica. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

3.10 Análise Estatística

As expressões de mRNA dos genes *APEX1*, *PolB*, *RAC1* e *NFκβ* foram expressas como média e amplitude (máxima e mínima), a fim de determinar a possível associação entre expressões gênicas relativas e as variáveis. Cada amostra foi realizada em duplicata e a expressão as razões foram calculadas usando o método $2^{-\Delta Cq}$. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Outliers foram removidos. O teste t de Student ou a análise unidirecional da variância com o teste post hoc de Tukey / Games-Howell foram usados para analisar as associações entre a expressão gênica e as variáveis. A homogeneidade das variâncias para todas as variáveis foi testada pelo teste de Levene. Para todas as análises, considerou-se $p < 0,05$ para significância estatística. A análise estatística foi desenvolvida usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.21.

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e laboratoriais

A população estudada foi constituída de 98 pacientes com AF, com idade variando de 18 a 68 anos, com média de 32 anos, sendo 68 em uso de HU (HbSSHU) e 30 sem o HU (HbSS). Em relação ao sexo foram 59 (60,2%) do sexo feminino e 39 (39,8%) do sexo masculino. Quanto à origem 43 (45,2%) pacientes eram de Fortaleza e 55 (54,8%) do interior do estado, com média de peso de 56,26 kg (34,41- 87,80 kg), altura média de 1,59 (1,29-1,86), com IMC médio de 21,90 (16,71 – 33,7), pressão sistólica média de 110,76 mmHg (80 – 180) e pressão diastólica, média 67,89 mmHg (38 – 100). O tempo de diagnóstico dos pacientes foi de 24 (2-49) anos. As características demográficas e hematológicas dos pacientes com AF estão apresentados na Tabela 2.

O grupo HbAA foi constituído por 28 doadores voluntários de sangue, sem hemoglobinopatias.

Tabela 2 - Caracterização epidemiológica dos pacientes com Anemia Falciforme (n=98)

Parâmetros demográficos e laboratoriais	Número absoluto (%) ou média (Mínimo – Máximo)	
Variável	Valores	
Origem, N (%)	Fortaleza	43 (45,2%)
	Interior do estado	55 (54,8%)
Idade, média (anos)	32 (18-68)	
Sexo N (%)	Feminino	59 (60,2%)
	Masculino	39 (39,8%)
Peso, média (kg)	56,26 (34,41 -87,80)	
Altura, média (metros)	1,59 (1,29 – 1,86)	
IMC, média	21,90 (16,71 – 33,7)	
Pressão sistólica mmHg, média	110,76 (80 – 180)	
Pressão diastólica mmHg, média	67,89 (38 – 100)	
Tempo do diagnóstico (anos), média	24 (2-49)	

Nota: Os valores acima apresentados foram como Número absoluto (%) ou média (Mínimo – Máximo).

A Tabela 3 descreve os padrões laboratoriais (hematológico e bioquímico) apresentados pelo grupo de pacientes com anemia falciforme.

Tabela 3 – Características dos dados laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme. (n = 98)

Parâmetros laboratoriais	Média (Mínimo – Máximo)
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	2,51(1,30-4,80)
Hemoglobina (g/dL)	9,37 (5,80-14,90)
Hematócrito (%)	27,11 (16,70-43,60)
VCM (fL)	108,75 (11,70-155,78)
HCM (pg)	38,54 (20,88-88,00)
CHCM (g/dL)	35,14 (30,47-88,00)
Leucócitos (/mm ³)	9834,02 (4449,00-19760,00)
Neutrófilos (/mm ³)	5059,87 (1279,00-14442,00)
Plaquetas (/mm ³)	358589,13 (134600,00-659600,00)
Reticulócitos(/mm ³)	223356,82 (47980,00-479400,00)
HbA2 (%)	2,80 (2,30-3,50)
HbF (%)	13,24 (1,80- 34,60)
HbS (%)	79,61 (22,40-93,30)
Ureia (mg/dL)	19,77 (8,00-119,00)
Creatinina (mg/dL)	0,66 (0,30-5,00)
LDH (UI/L)	878,64 (375,00-1863,00)
Ácido úrico (mg/dL)	4,79 (2,40-10,20)
BT (mg/dL)	3,03 (0,68-13,57)
BD (mg/dL)	0,49 (0,06-3,18)
BI (mg/dL)	2,54 (0,55-12,80)
TGO (U/L)	43,09 (17,00-114,00)
TGP (U/L)	31,77 (10,00-251,00)
FAL (mg/dL)	231,09 (60,00-505,00)
GGT (U/L)	61,04 (13,00-344,00)
Ferro Sérico (mg/dL)	117,54 (24,00-266,00)
Ferritina (ng/dL)	467,38 (19,90-2768,00)

Nota: Os valores acima apresentados foram como média (Mínimo – Máximo) Legenda: Hidroxiuréia (HU); Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), lactato desidrogenase (LDH), Bilirrubina Total (BT), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Indireta (BI) Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FAL). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A Tabela 4 está descrevendo os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes com AF, em relação ao uso da HU. Foi observado um aumento significativo entre as variáveis VCM, HCM e dosagem de ferro sérico e uma redução significante nas contagens de

leucócitos, neutrófilos, HbS, LDH, BT e BD no grupo em uso contínuo de HU em relação ao grupo sem uso do fármaco. Nos demais parâmetros não houve diferença entre os grupos estratificados em relação ao uso do HU.

A figura 8 demonstra a diferença entre o número de leucócitos e neutrófilos entre pacientes com e sem o uso do HU, demonstrando uma ação citorrredutora significativa nos pacientes em uso da HU quando comparado ao grupo de pacientes que não fazem uso do fármaco.

A figura 9 demonstra as diferenças entre as concentrações de HbF e HbS entre pacientes com e sem o uso do HU, demonstrando uma redução na concentração de HbS significativa nos pacientes em uso da HU quando comparado ao grupo de pacientes que não fazem uso do fármaco, entretanto não foi observada diferenças estatísticas nas concentrações de HbF entre o grupo estudado.

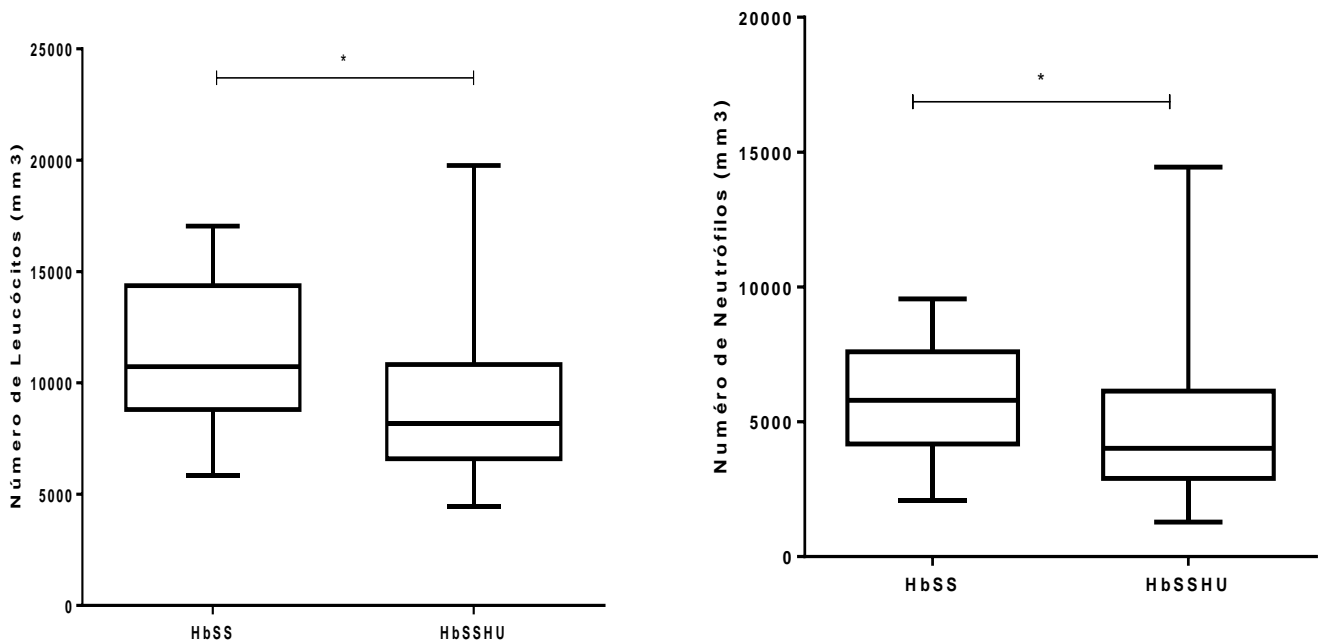
A tabela 5 descreve os parâmetros laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) dos pacientes com AF, em relação ao percentual da concentração da HbF (<15%, 15-25% e >25%) (JIT *et al.*, 2019). Observou-se um aumento significativo entre as variáveis do grupo com maiores níveis de HbF quanto ao VCM e HCM, este mesmo grupo apresentou uma redução dos leucócitos e neutrófilos em comparação aos outros grupos com níveis menores de HbF. Nos parâmetros bioquímicos foi observado redução de LDH, BT e BTI nos pacientes que apresentam maiores níveis de HbF em comparação ao grupo com níveis HbF < 15%. Nos demais parâmetros não houve diferença entre os grupos.

Tabela 4 – Características hematológico e bioquímico dos pacientes com Anemia Falciforme tratados ou não com HU.

Parâmetros demográficos e laboratoriais	Média (%) ou mínimo – Máximo		Valor de <i>p</i>
	HbSS (n=30)	HbSSHU(n=68)	
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	2,61 (1,40 – 3,80)	2,45 (1,30-4,80)	0,102
Hemoglobina (g/dL)	8,96 (5,8 – 12)	9,49 (5,80-14,90)	0,119
Hematócrito (%)	26,03(16,9 – 36)	27,44 (16,70-43,60)	0,118
VCM (fL)	100,92 (68,53 – 123,57)	112,40 (11,70-155,78)	<0,001
HCM (pg)	34,81 (20,88 – 42,31)	39,35 (28,00-48,42)	<0,001
CHCM (g/dL)	34,45 (30,47 – 37,40)	34,61 (31,08-39,20)	0,920
Leucócitos (/mm ³)	11218 (5823 – 17040)	9261 (4449-19760)	0,012
Neutrófilos (/mm ³)	5843 (2079 - 9554)	4742 (1279-14442)	0,017
Plaquetas (/mm ³)	388892 (134600 – 641000)	347486 (145100-659600)	0,132
Hemoglobina A2 (%)	3,32(2,80-3,50)	3,18 (2,30-3,20)	0,617
Hemoglobina F (%)	12,38(1,80-29,00)	13,65 (2,70-34,60)	0,390
Hemoglobina S (%)	82,39(67,40-92,00)	78,36 (22,40-93,30)	0,023
Ureia (mg/dL)	18,35 (10- 55)	20,34 (8,00-119,00)	0,393
Creatinina (mg/dL)	0,57 (0.30 – 1.4)	0,69 (0,30-5,00)	0,495
LDH (UI/L)	1005,65 (509 – 1863)	827,05 (375,00-1668,00)	0,014
Ácido úrico (mg/dL)	5,25 (2.70 – 9.8)	4,67 (2,40-10,20)	0,174
BT (mg/dL)	4,05 (1.18 – 13.57)	2,63 (0,68-7,95)	0,054
BD (mg/dL)	0,61 (0,21 – 3.18)	0,44 (0,06-2,61)	0,007
BI (mg/dL)	3,44 (0,84 – 12,8)	2,18 (0,55-7,03)	0,070
TGO (U/L)	45,35 (18 – 88)	42,18 (17-114)	0,229
TGP (U/L)	37,27 (11 – 251)	29,57 (10,00-88,00)	0,843
FAL (mg/dL)	243,52 (60- 505)	226,16 (63,00-503,00)	0,397
GGT (U/L)	65,46 (19 – 299)	59,30 (13,00-344,00)	0,310
Ferro sérico (mg/dL)	99,67 (24- 174)	124,35 (43,00-266,00)	0,040
Ferritina (ng/dL)	450,49 (27,9 2768)	473,46 (19,90-2261,00)	0,207

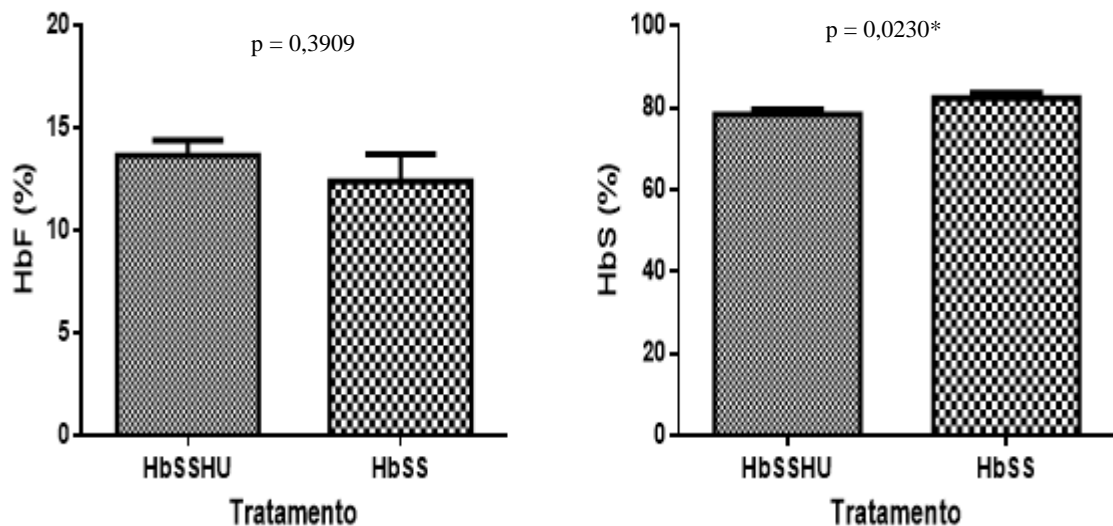
Legenda: Hidroxiuréia (HU); Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), lactato desidrogenase (LDH), Bilirrubina Total (BT), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Indireta (BI), Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FAL). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Figura 8 - Análise do número de leucócitos e neutrófilos entre pacientes com uso e sem uso de Hu.



Nota: Representação gráfica dos números de leucócitos e neutrófilos entre pacientes com e sem uso da HU. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$, foi observada uma redução de leucócitos e neutrófilos no grupo HbSSHU em comparação com o grupo HbSS. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Figura 9 - Análise da concentração da HbF e HbS entre pacientes com uso e sem uso de HU.



Nota: Representação gráfica da concentração de HbF e HbS entre pacientes com e sem uso da HU. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$, foi observada uma redução na contração de HbS no grupo HbSSHU em comparação com o grupo HbSS, não foi observada diferenças estatísticas entre as concentrações de HbF entre os grupos. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Tabela 5 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes com Anemia Falciforme de acordo com as concentrações de HbF.

	Concentração de HbF			Valor de p
	<15%	Média (Mínimo – Máximo) 15-25%	>25%	
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	2,53 (1,30-4,80)	2,50 (1,40-3,80)	2,38 (1,90-3,20)	0,835
Hemoglobina (g/dL)	9,15 (5,80-14,90)	9,80 (5,80-12,20)	9,92 (9,20-12,00)	0,176
Hematócrito (%)	26,42 (16,70-43,60)	28,45 (17,30-36,00)	29,12 (24,70-35,60)	0,129
VCM (fL)	104,56 (11,70-134,62)	115,86 (94,74-134,74)	124,90 (100,00-155,78)	0,001*
HCM (pg)	36,82 (20,88-46,92)	39,87 (30,00-47,14)	42,52 (35,38-48,42)	0,002*
CHCM (g/dL)	34,66 (30,47-39,20)	34,44(31,67-37,77)	34,22 (31,08-37,25)	0,708
Leucócitos (/mm ³)	10565,76 (4581,00-19760,00)	8566,96 (4449,00-17860,00)	6668,40 (5823,00-7460,00)	0,004*
Neutrófilos (/mm ³)	5534,97(1738,00-14442,00)	4242,70 (1279,00-12859,00)	3216,40 (2575,00-4027,00)	0,019*
Plaquetas (/mm ³)	366572,88 (145100,00-641000,00)	339703,70 (134600,00-659600,00)	3216,40 (2575,00-4027,00)	0,569
Hemoglobina A2 (%)	3,41 (2,50-3,50)	3,10 (2,45-3,22)	2,34 (2,30-3,00)	0,081
Hemoglobina S (%)	82,47 (22,40-93,30)	76,07 (67,20-80,50)	65,34 (57,80-70,50)	<0,001
Ureia (mg/dL)	18,60 (8,00-119,00)	20,85 (8,00-55,00)	29,20 (19,0-44,00)	0,214
Creatinina (mg/dL)	0,65 (,30-5,00)	0,65 (0,30-1,40)	0,85 (0,60-1,34)	0,726
LDH (UI/L)	936,09 (503,00-1863,00)	785,00 (375,00-1668,00)	671,80 (496,00-936,00)	0,044*
Ácido úrico (mg/dL)	4,79 (2,40-10,20)	4,60 (2,90-8,30)	5,95 (4,50-7,20)	0,252
BT (mg/dL)	3,43 (0,99-13,57)	2,35 (0,80-4,71)	1,44 (0,68-2,33)	0,035*
BD (mg/dL)	0,45 (0,06-1,38)	0,52 (0,16-2,61)	0,34 (0,13-0,61)	0,456
BI (mg/dL)	2,98 (0,80-12,80)	1,83 (0,57-3,71)	1,10 (0,55-2,01)	0,023*
TGO (U/L)	45,74 (18,00-114,00)	38,52 (17,00-88,00)	29,40 (22,00-36,00)	0,059
TGP (U/L)	28,36 (11,00-63,00)	31,59 (10,00-88,00)	28,40 (14,00-59,00)	0,641
GGT (U/L)	52,81 (13,00-203,00)	70,26 (14,00-344,00)	97,60 (32,00-299,00)	0,130
FAL (mg/dL)	231,07 (63,00-505,00)	241,81 (111,00-503,00)	187,60 (60,00-293,00)	0,446
Ferro sérico (mg/dL)	112,04 (24,00-266,00)	124,59 (43,00-213,00)	147,00 (105,00-209,00)	0,209
Ferritina (ng/dL)	430,88 (19,90-2768,00)	496,84 (50,50-1122,00)	779,65 (696,60-930,00)	0,340

Nota: Os valores acima foram apresentados como média (mínima-máxima). Valores de p foram considerados significantes quando p<0,05. Legenda: Hidroxiuréia (HU); Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), lactato desidrogenase (LDH), Bilirrubina Total (BT), Bilirrubina Direta (BD), Bilirrubina Indireta (BI), Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP), Gama Glutamil Transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FAL). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

4.2 Análise da expressão de mRNA de *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em relação ao tratamento com hidroxiuréia (HU).

4.2.1 Comparação da expressão dos genes relacionados ao uso ou não de HU e o grupo controle.

A análise de expressão (mRNA) dos genes de reparo e redox foram de acordo com a estratificação dos pacientes quanto ao uso (HbSSHU) ou não de HU (HbSS) e com o grupo controle (HbAA). Nessa comparação observamos que os pacientes não tratados com HU (HbSS) possuem menor nível de expressão (mRNA) *APEXI* quando comparado a indivíduos saudáveis (HbAA), e os pacientes tratados (HbSSHU), apresentando diferença estatística quanto a expressão entre o grupo de indivíduos saudáveis ($p=0,035$) (FIGURA10).

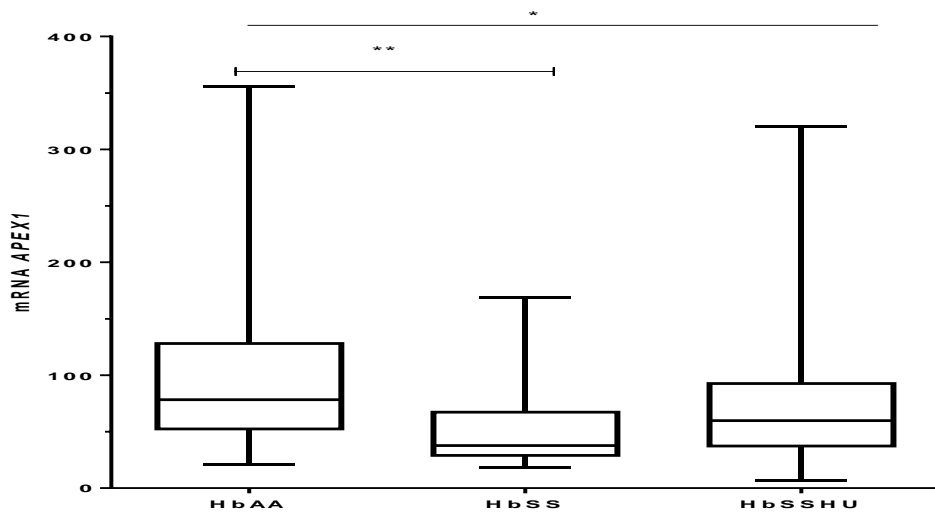
A tabela 6 descreve a análise de expressão (mRNA) dos genes *POLB* e *NFKB* de acordo com a estratificação dos pacientes quanto ao uso (HbSSHU), não uso de HU (HbSS) e com o grupo controle (HbAA). Não observamos diferenças estatísticas entre todos os grupos quanto aos níveis de expressão dos genes em questão.

Tabela 6 - Comparação da expressão (mRNA) de *POLB* e *NFKB* em pacientes com Anemia Falciforme relacionado com o uso ou não de HU e com o grupo controle.

	HbSS (n=30) Média (mín-máx)	HbSSHU (n=68) Média (mín-máx)	HbAA (n=28) Média (máx – mín)	p valor
mRNA_ <i>POLB</i>	241,13 (34,67-1290,40)	302,17 (32,53-1271,25)	261,57 (61,14-652,86)	0,311
mRNA_ <i>NFKB</i>	1269,97 (150,59-5852,52)	1219,00 (115,42-5486,07)	1559,48 (176,01-7251,08)	0,840

Nota: Representação dos níveis de expressão (mRNA) do *APEXI* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF sem uso de HU (HbSS) e em uso de HU (HbSSHU), valores de p foram considerados significantes quando $p<0,05$. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

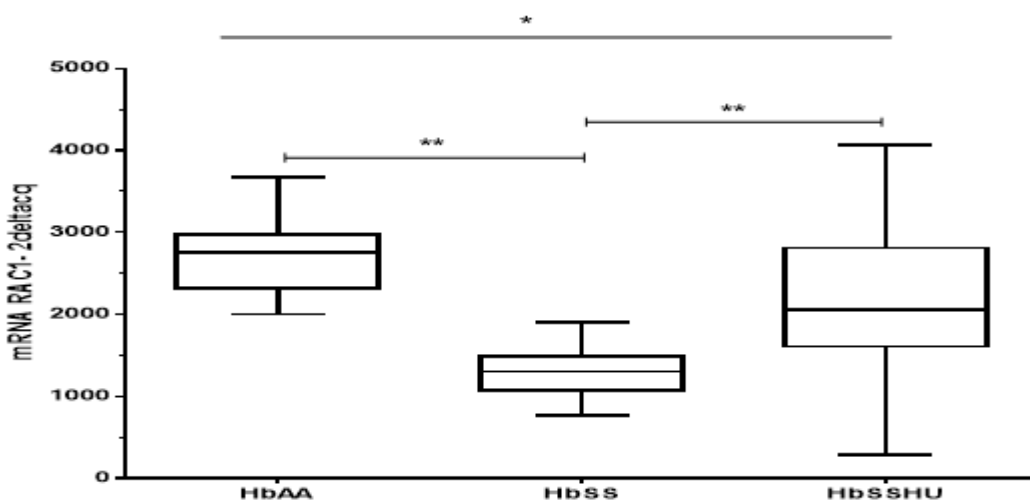
Figura 10 - Expressão (mRNA) de *APEX1* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com o uso de HU em relação aos controles.



Nota: Representação gráfica dos níveis de expressão (mRNA) do *APEX1* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF sem uso de HU (HbSS) e em uso de HU (HbSSHU), valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$ (* $p = 0,035$) (* $p < 0,05$ Anova; ** $p < 0,05$ Pós teste – Turkey). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Em pacientes com AF que não faziam uso de HU a expressão (mRNA) de *RAC1* também apresentou baixa expressão quando comparados aos indivíduos normais e quando comparado aos indivíduos que faziam uso de HU, apresentando diferença estatística entre todos os grupos (*, ** $p < 0,001$) (Tabela 8, Figura 11).

Figura 11- Expressão (mRNA) de *RAC1* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com o uso de HU.



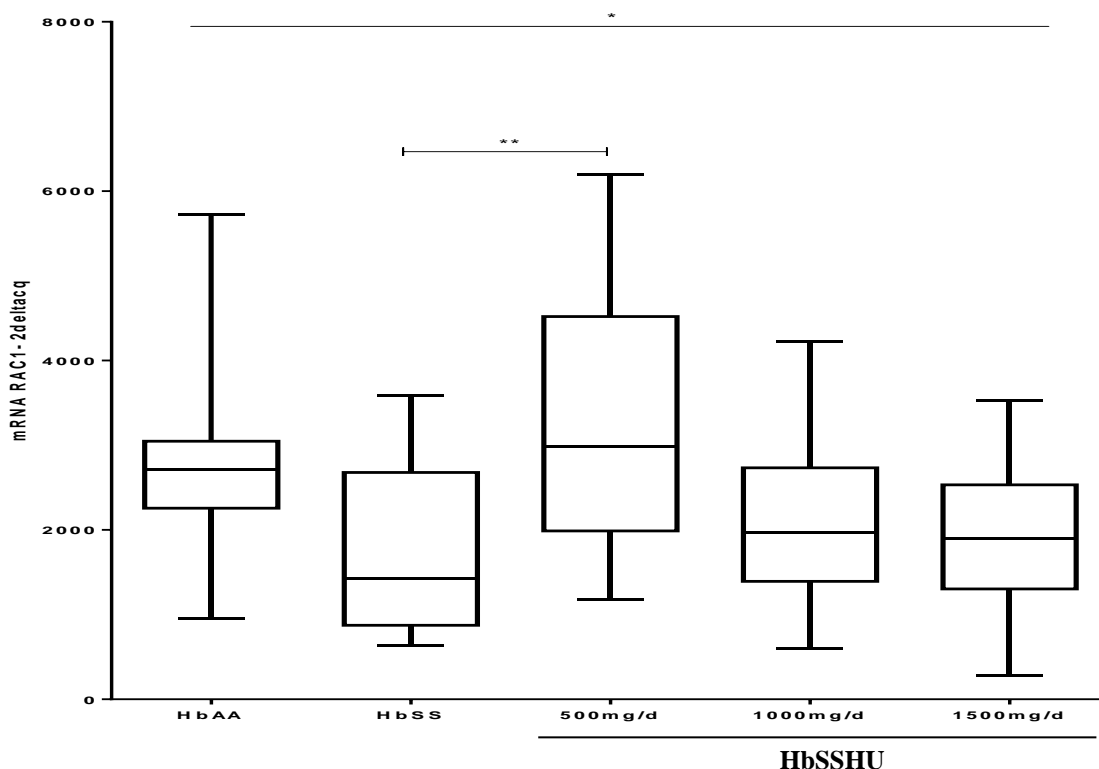
Nota: Representação gráfica dos níveis de expressão (mRNA) de *RAC1* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF sem uso de HU (HbSS) e em uso de HU (HbSSHU), valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$ (*, ** $p < 0,001$) (* $p < 0,05$ Anova; ** $p < 0,05$ Pós teste – Turkey). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Não foram observadas diferenças estatísticas quanto à expressão (mRNA) de *POLB* e (mRNA) de *NFKB* entre pacientes HbSS em uso de HU e não tratado com HU e com o grupo controle.

4.2.2 Expressão (mRNA) de *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a dose de HU.

A análise de expressão (mRNA) de *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* foram de acordo com a estratificação dos pacientes quanto ao não uso de HU (HbSS) ou uso de HU (HbSSHU) e segundo a dose da terapia empregada (500mg/dia; 1000mg/dia; 1500mg/dia) e com o grupo controle (HbAA). Observamos que os pacientes não tratados com HU apresentam níveis mais baixos da expressão (mRNA) de *RAC1* quando comparado a todos os grupos estratificados, porém este grupo de pacientes não tratados (HbSS) apresentou diferenças significativas quando comparados ao grupo de pacientes tratados com a menor dose do fármaco (500mg/dia) (FIGURA 12).

Figura 12 - Expressão (mRNA) de *RAC1* de acordo com a dose de HU em pacientes com AF.

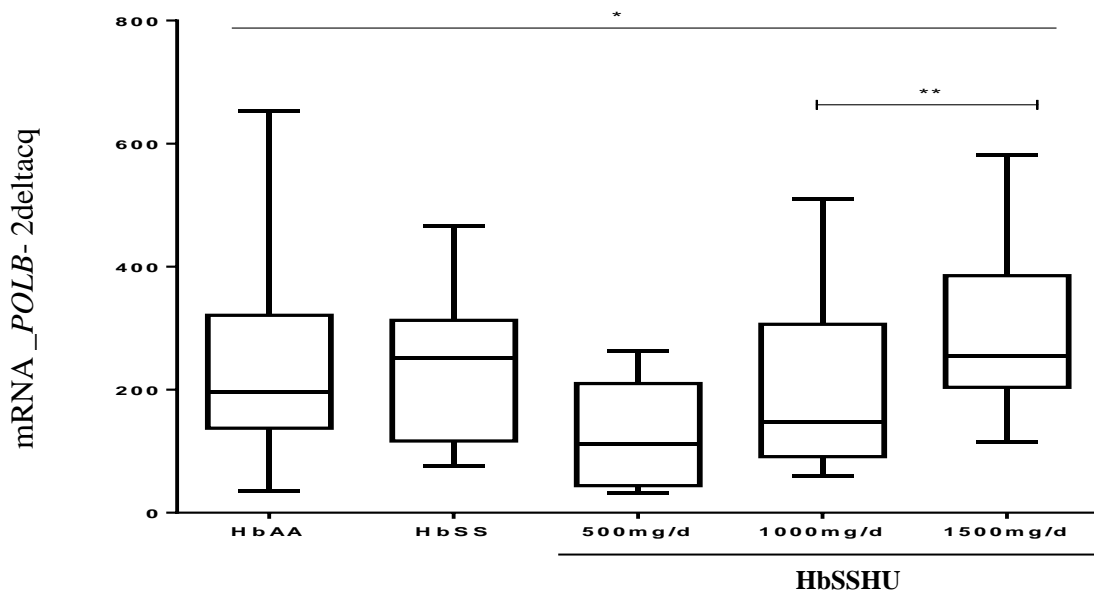


Nota: Representação gráfica dos níveis de expressão (mRNA) de *RAC1* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF sem uso de HU (HbSS) e em uso de HU de acordo com a dose (500mg/dia; 1000mg/dia; 1500mg/dia). Legenda: * $p < 0,05$ Anova; ** $p < 0,05$, Pós teste – Turkey. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Na figura 13 apresentamos a avaliação de expressão do gene *POLB*, em comparação do grupo não tratado com HU (HbSS), o grupo tratado (HbSSHU) quanto a dose de HU utilizada na terapia (500mg/dia; 1000mg/dia; 1500mg/dia) e ao grupo de indivíduos saudáveis (HbAA).

Nossos achados relatam que os pacientes tratados com as maiores doses de HU (1500mg/dia) apresentaram diferenças estatísticas nos níveis de expressão (mRNA) do gene em questão, apresentando aumentado dos níveis de *POLB* em comparação ao grupo que recebia uma dose menor (1000mg/dia) (FIGURA13).

Figura 13 - Expressão do gene *POLB* em pacientes com AF de acordo com a dose de HU.



Nota: Representação gráfica dos níveis de expressão do gene *POLB* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF sem uso de HU (HbSS) e em uso de HU de acordo com a dose (500mg/dia; 1000mg/dia; 1500mg/dia), valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ Anova; ** $p < 0,05$, Pós teste – Turkey). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

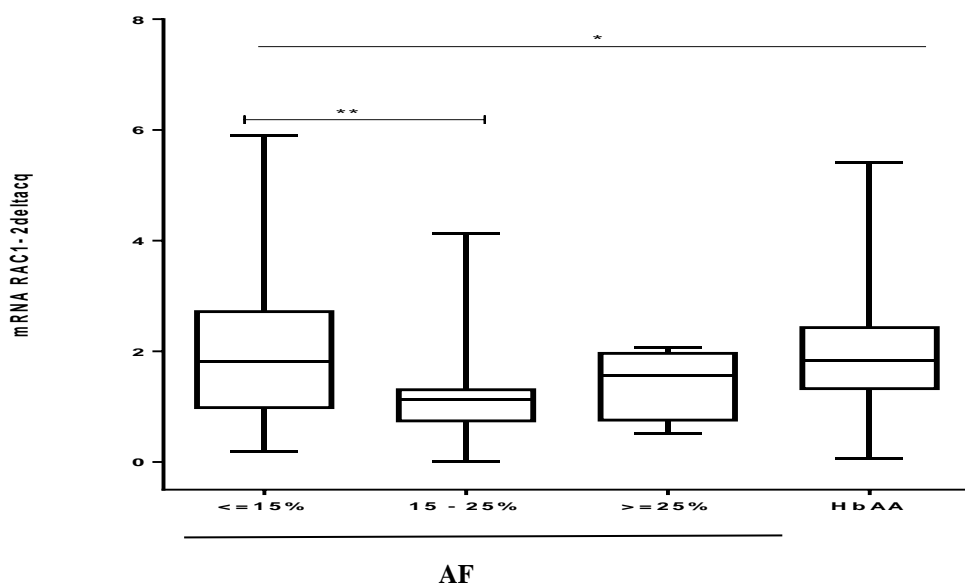
Não foram observadas diferenças estatísticas quanto a expressão (mRNA) de *APEX1* e *NFKB* em relação a dose do fármaco.

4.2.3 Expressão (mRNA) de *APEX1*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com os níveis de HbF.

A análise de expressão (mRNA) de *APEX1*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* foram de acordo com a estratificação dos pacientes quanto aos níveis de HbF ($\leq 15\%$, $15-25\%$, $\geq 25\%$) e com o

grupo controle (HbAA). Percebemos que pacientes com concentração de HbF entre 15-25% apresentaram baixo nível de expressão (mRNA) de *RAC1* quando comparados ao grupo com níveis de HbF $\leq 15\%$, apresentando diferença significativas ($p < 0,05$) (FIGURA 14).

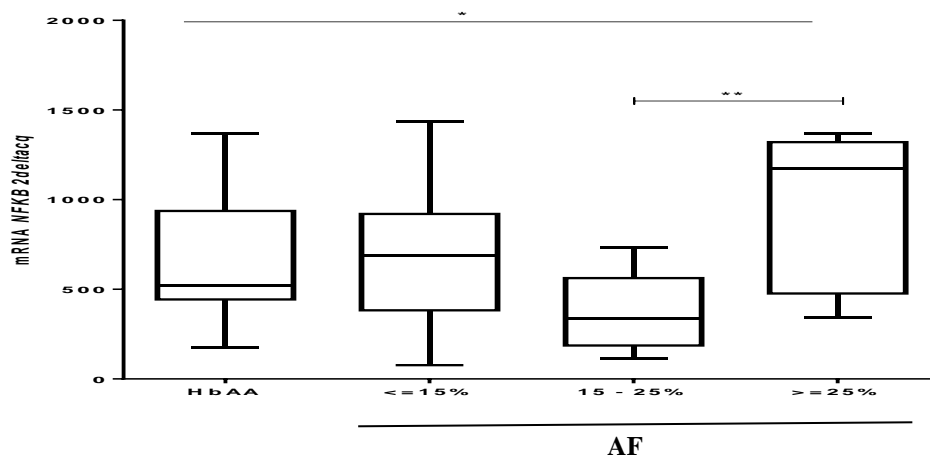
Figura 14 - Expressão (mRNA) de *RAC1* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com os níveis de HbF.



Nota: Representação gráfica dos níveis de expressão (mRNA) de *RAC1* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF de acordo com os níveis de hemoglobina fetal (HbF), valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ Anova; ** $p < 0,05$, Pós teste – Turkey). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A figura 15 representa os níveis de expressão (mRNA) de *NFKB* em pacientes AF quanto os níveis de HbF ($\leq 15\%$, 15-25%, $\geq 25\%$) em comparação ao grupo controle. Foi observado que os pacientes AF com os maiores níveis de HbF ($\geq 25\%$) apresentaram os maiores níveis da expressão (mRNA) do *NFKB* quando comparado aos grupos com menores níveis de HbF e ao controle, apresentando diferença estatística significantes quando comparado ao grupo com níveis de HbF de 15-25% (FIGURA 15).

Figura 15 - Expressão (mRNA) do *NFKB* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a concentração de HbF.



Nota: Representação gráfica dos níveis de expressão (mRNA) do *NFKB* entre o grupo controle (HbAA) e os grupos de pacientes AF de acordo com os níveis de HbF, valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ Anova; ** $p < 0,05$, Pós teste – Turkey). Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Não foram observadas diferenças estatísticas quanto a expressão (mRNA) de *APEX1* e *POLB* em relação aos níveis de HbF.

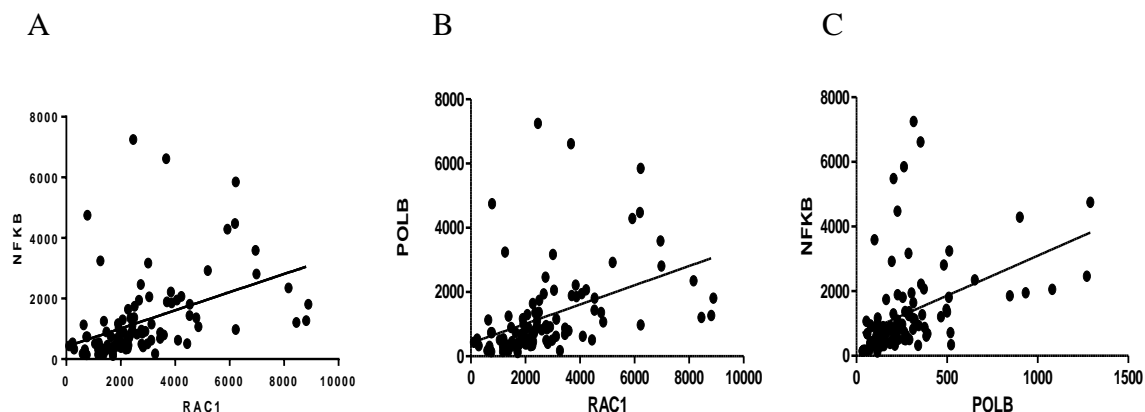
Ao realizar a análise de correlação gênica, foi observado que os genes *NFKB* e *RAC1* ($P < 0,001$ e $R = 0,1730$), *POLB* e *RAC1* ($p < 0,001$, $R = 0,1760$) e *NFKB* e *POLB* ($p < 0,001$ e $R = 0,1809$) se correlacionam positivamente e moderadamente nos pacientes com Anemia Falciforme (Figuras 16, Tabela 7).

Tabela 7. Análise de correlação dos genes *APEX1*, *POLB*, *NFKB* e *RAC1* em pacientes com Anemia Falciforme.

		Correlação			
		mRNA_RAC1_2deltacq	mRNA_APEX1_2deltacq	mRNA_POLB_2deltacq	mRNA_NFKB_2deltacq
mRNA_RAC1	Pearson Correlation	1	,001	,307**	,420**
	Sig. (2-tailed)		,993	,002	,000
	N	104	103	104	100
mRNA_APEX1	Pearson Correlation	,001	1	,022	-,003
	Sig. (2-tailed)	,993		,827	,977
	N	103	105	105	100
mRNA_POLB	Pearson Correlation	,307**	,022	1	,425**
	Sig. (2-tailed)	,002	,827		,000
	N	104	105	106	101
mRNA_NFKB	Pearson Correlation	,420**	-,003	,425**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	,977	,000	
	N	100	100	101	101

Nota: análise de representação da correlação de Pearson dos genes estudados dos níveis de expressão (mRNA) de *APEX1*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em pacientes AF. **. Correlação é significativa no nível 0,01 (Bicaudal).

Figura 16 - Análise de correlação entre os genes *APEXI*, *POLB*, *NFKB* e *RAC1* em pacientes com Anemia Falciforme.



Nota: A) Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os genes *NFKB* e *RAC1*, indicando uma correlação positiva entre os genes em questão ($p < 0,001$, $R = 0,1730$). B) Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os genes *POLB* e *RAC1*, indicando uma correlação positiva entre os genes em questão ($p < 0,001$, $R = 0,1760$). C) Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre os genes *NFKB* e *POLB*, indicando uma correlação positiva entre os genes em questão ($p < 0,001$ e $R = 0,1809$).

4.2.4 Análise da expressão (mRNA) de *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a gravidade da doença.

Ao avaliarmos a variável gravidade da AF observamos maiores níveis de expressão (mRNA) dos genes *APEXI* e *POLB* nas formas mais graves da doença, quanto a expressão do gene *RAC1* foi observada uma maior expressão na forma mais leve da doença e os níveis de expressão de *NFKB* apresentam-se mais expressos na forma intermediária da AF (Tabela 8).

Tabela 8 - Expressão do mRNA de *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em pacientes com Anemia Falciforme de acordo com a gravidade da doença.

	Níveis de gravidade da AF		
	LEVE (n=59)	INTERMEDIARIO (n=21)	GRAVE (n=18)
	Média (mín-máx)	Média (mín-máx)	Média (mín-máx)
mRNA_ <i>APEXI</i> _	74,61 (7,12 -445,77)	82,74 (29,08 -243,38)	108,77 (26,11 -514,86)
mRNA_ <i>POLB</i> _	201,96 (32,53 -687,72)	190,88 (73,66 -466,44)	282,99 (59,47 -581,20)
mRNA_ <i>RAC1</i> _	2219,96 (284,11 -6195,15)	1834,63 (773,11 -2734,75)	2158,00 (1176,68 -3530,55)
mRNA_ <i>NFKB</i> _	628,69 (143,55 -1433,40)	706,23 (192,18 -1293,74)	618,86 (115,42 -1369,23)

Nota: Representação dos níveis de expressão dos genes *APEXI*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* no grupo de pacientes AF de acordo com a gravidade da doença que foi dividida em leve, intermediária e grave de acordo com Sebastiani *et al.*, 2007.

5. DISCUSSÃO

A anemia Falciforme é uma doença genética hematológica caracterizada por um quadro clínico e laboratorial variável, sendo a anemia do tipo hemolítico e crônico, com quadro recorrente de vaso-oclusão. Destaca-se ainda que a doença apresenta um processo inflamatório sistêmico crônico também de grau variável (WILLIAMS; THEIN., 2018). Trata-se de uma doença incurável cujo tratamento é feito principalmente com uso da Hidroxiuréia (HU). A HU aumenta os níveis de hemoglobinas fetal e conseqüentemente reduz tanto o quadro hemolítico como o quadro inflamatório.

No presente estudo, observamos um discreto predomínio da anemia falciforme no gênero feminino quando comparado ao gênero masculino, com idade média de 32 anos. Resultados esses que corroboram com a literatura, por não ter relação com sexo, fato que corrobora com dados previamente publicados (VICARI.; BARRETTO.; FIGUEIREDO., 2005; MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA., 2010). Os pacientes apresentaram média de peso, altura, ICM, Pressão sistólica mmHg e Pressão diastólica mmHg dentro da normalidade. A média de 24 anos de tempo do diagnóstico. Em relação a origem verificamos que todos os pacientes são do estado do Ceará, sendo a maioria do interior do estado e o ambulatório em que os pacientes são atendidos é de referência do estado do Ceará.

Ao se analisar os dados hematológicos dos pacientes em relação ao uso ou não da HU verificou-se um aumento significativo nos valores de VCM e HCM nos pacientes em uso deste fármaco. Estudos têm demonstrado que a HU aumenta o VCM, através de mecanismo pouco esclarecido, porém sabe-se que esse aumento contribui com a redução da concentração intracelular da HbS e conseqüentemente diminuição da polimerização e das crises de vaso-oclusão (ALLISON.,1954; SILVA-PINTO *et al.*, 2013; MINNITI *et al.*, 2014). Além disso, foi observada também uma diminuição na quantidade de leucócitos e de neutrófilos, resultados concordantes com a literatura. A HU é capaz de inibir a enzima ribonucleotideo redutase (RR) levando a parada do ciclo celular e agindo como uma droga citorredutora (WARE., 2010; MCGANN; WARE., 2015; KIM -SHAPIRO *et al.*, 2018; GLADWIN *et al.*, 2011; ZIMMERMAN *et al.*, 2004; VOSKARIDOU *et al.*, 2010).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, observamos que a HU promoveu uma redução significativa nos biomarcadores de hemólise LDH, BT e BD. Achado demonstrado também em outros estudos (SANT'ANA *et al.*, 2017; BREWIN *et al.*, 2019). Foi observado também um aumentado significativo do ferro sérico em pacientes que utilizaram a HU. As transfusões de hemácias podem contribuir com o aumento do ferro tanto do sangue periférico,

como o de depósito (COATES; WOOD, 2017), logo pacientes politransfundidos podem apresentar hemocromatose secundária.

Ao analisar os níveis de HbF em pacientes com AF, nas maiores concentrações ocorreram aumento de VCM, HCM, redução de leucócitos, neutrófilos e nos parâmetros de hemólise. Resultados esses semelhantes aos revelados pelo uso da HU, fato que provavelmente está relacionado ao uso da mesma, uma vez que um dos mecanismos de ação é o aumento da concentração da HbF. Achados esses que corroboram com os resultados de Laurentino *et al.*, (2014) e Akingbola *et al.*, (2018), que demonstraram um aumento nos níveis de HbF em pacientes com AF, em uso de HU, no Estado do Ceará, Brasil e na Nigéria, África, respectivamente. Estudos recentes têm demonstrado que o uso da HU na AF aumenta de 30 a 40% a quantidade de células F (células contendo HbF), e que as mesmas contem de 15 a 16% a menos de HbS. Portanto, a HU aumenta o número de células F mais do que o percentual de HbF, no interior das hemácias (AGUIAR *et al.*, 2016).

Em seguida avaliamos o perfil de expressão dos genes de reparo de DNA na população em estudo. Vale ressaltar que a AF não é uma doença neoplásica, porém apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade, além do uso crônico de um quimioterápico, que é a HU. A HU, como já acima descrito, tem a capacidade de elevar um importante modulador clínico da doença que é a HbF.

Foram avaliados a expressão dos genes *APEXI* e *POLB*. Os resultados da expressão com o *APEXI* demonstraram uma baixa expressão do mesmo nos pacientes com AF em relação ao grupo sem a doença (HbAA). Esse fato pode ser atribuído ao comprometimento do mecanismo de reparo do DNA nesses pacientes e que pode ser associado ao processo inflamatório crônico e ao aumento do estresse oxidativo, bem descritos na fisiopatologia da AF. Ressaltamos que até o momento não encontramos trabalhos na literatura avaliando a expressão desse gene de reparo *APEXI*, em paciente com AF. Entretanto, Zaky *et al.*, 2018, ao analisarem a expressão do gene *APEXI* em ratos submetidos a um modelo de indução de processo inflamatório observaram uma redução de cerca de 30% no total da expressão do gene, indicando que o mesmo é inibido quando exposto a processos de estresse oxidativo, mecanismo mediado pela função redox.

Ao se estratificar os pacientes em relação ao uso de HU verificamos que na ausência do medicamento (HbSS) houve uma redução da expressão do *APEXI* em relação aos pacientes em uso de HU (HbSSHU), fato que reforça a hipótese de que a redução da expressão do gene *APEXI* se deva a um mecanismo inerente a doença. Ressaltando que a HU é um fármaco que tem uma ação genotóxica e, portanto, ativa mais as vias de reparo do DNA,

hipótese essa que se solidifica com os achados da maior expressão do *APEXI* em pacientes que usam as maiores doses do fármaco. Para analisar se o *APEXI* pode ser modulado por estresse oxidativo afetando a proteção celular, Grosch, Fritz e Kaina (1998), verificaram a expressão de *APEXI* em células de ovário de hamster chinês (CHO) após o tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou hipoclorito de sódio (NaOCl) e observaram aumento dos níveis de mRNA e da expressão da proteína de *APEXI*, resultado atribuído a exposição de agentes genotóxico.

Em relação ao *POLB*, verificamos que não houve diferença entre o grupo com AF e o grupo controle, porém ao se estratificar o grupo em uso de HU e em relação a dose verificamos resultados semelhantes aos obtidos à expressão de *APEXI*, indicando que o fármaco aumenta os níveis da expressão desse gene. Porém, nossos achados não demonstraram que *APEXI* influencia no aumento de *POLB*, dado que difere de Pei *et al.*, (2019) que verificaram que o aumento da expressão do *APEXI* resulta em aumento tanto do Creb1 como dos níveis de participantes da via BER (*OGG1* e *POLB*), que juntamente com a *APEXI* reparam o DNA danificado por oxidação, demonstrando que a via de reparo e a via redox é ativada concomitantemente no dano oxidativo do DNA.

Os genes acima estudados estão relacionados ao reparo de DNA, logo os resultados sugerem que possivelmente exista uma modulação na expressão desses genes na AF e que o uso da HU pode estar ativando vias de reparo da excisão de bases. O uso da HU recentemente tem sido associado a danos no DNA. Pesquisa realizada por nosso grupo publicado em 2019 reporta o efeito genotóxico em pacientes com AF do mesmo serviço em uso do HU (MAIA-FILHO *et al.*, 2019). Estudo tem reportado também, que pacientes com AF apresentam o maior risco de desenvolver uma neoplasia sem estar associado ao uso de HU (BRUNSON *et al.*, (2018).

Os resultados da expressão com o *RAC1* demonstraram uma elevação da expressão do mesmo nos pacientes com AF em relação ao grupo sem a doença (HbAA), além disso, a análise molecular mostrou que os pacientes não tratados com HU apresentaram níveis menores de expressão (mRNA) de *RAC1* quando em comparação com pacientes tratados com o fármaco. Ao avaliarmos quanto a dose de HU, observamos que pacientes tratados com doses de 500mg/dia apresentam uma elevação da expressão do referido gene, em relação aos pacientes sem o uso do fármaco. Fato esse provavelmente atribuído a diferença amostral entre os grupos. Ao avaliarmos a expressão de *RAC1* em relação aos níveis de HbF, foi observado que os pacientes com níveis de HbF entre 15-25% apresentaram uma diminuição significativa da expressão do gene quando comparados ao grupo com menores níveis de HbF(<15%),

possivelmente influenciada pela diferença amostral entre os grupos, pois a grande maioria dos pacientes apresentaram níveis baixos de HbF.

Nosso trabalho demonstra que a HU possivelmente modula a via de estresse oxidativo, e que em pacientes não tratados com o fármaco apresentaram níveis mais baixos. George *et al.*, 2010 ao avaliarem o estresse oxidativo em células falciforme, demonstraram que o aumento do estresse oxidativo na doença é devido a diversos fatores como a hemólise, a vaso-oclusão, a inflamação, ocasionados principalmente pelas células HbS e que o aumento da função aberrante de *RAC1* pode afetar os eritrócitos falciformes agravando a rigidez e a fragilidade dessas células. A AF é uma doença genética caracterizada por uma mutação pontual, no entanto a doença se apresenta com um quadro inflamatório sistêmico, além das crises de hemólise e das crises de vaso-oclusão, um processo inflamatório sistêmico, dano endotelial e aumento do estresse oxidativo. Pacientes com AF tem comprovadamente na literatura diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico e aumento de estresse oxidativo (KATO *et al.*, 2006; LAZZARETTI *et al.*, 2008; HERMANN *et al.*, 2016).

Ao analisar a expressão do gene *NFKB* quanto ao uso de HU observamos que os pacientes com maiores níveis de HbF ($\geq 25\%$) apresentaram um aumento significativo da expressão (mRNA) do *NFKB* quando comparado ao grupo com níveis de HbF de 15-25%. Fato que pode estar relacionado ao pequeno grupo de pacientes com o maior nível de HbF, e que mesmo com elevados valores de HbF ainda apresentam quadro clínico grave.

Ao analisar a correlação entre os genes, observamos correlação positivas entre os dois genes envolvidos na via de reparo o *POLB* com os genes relacionados a produção de estresse oxidativo e a processos inflamatórios, *POLB* e *RAC 1* ($p < 0,001$, $R = 0,1760$), *NFKB* e *POLB* ($p < 0,001$ e $R = 0,1809$) e entre os genes *NFKB* e *RAC1* ($P < 0,001$ e $R = 0,1730$), sugerindo que a via de reparo de excisão de base está sendo acionada e tentando corrigir os danos e que os processos de produção de estresse oxidativos e inflamatórios possivelmente estão envolvidos.

Ao avaliarmos a expressão dos genes estudados com uma estratificação clínica dos pacientes com AF, verificamos que a forma grave da doença apresentou os maiores níveis de expressão (mRNA) dos genes *APEX1* e *POLB*, já na forma intermediária observamos uma elevada expressão de *NFKB* e na forma leve observamos uma maior expressão de *RAC1*. Possivelmente a elevada expressão desses genes possa estar relacionado ao aumento do reparo de DNA induzindo pelo grau do quadro crônico inflamatório e de estresse oxidativo.

Nossos achados contribuem para um melhor entendimento da expressão desses genes *APEX1*, *POLB*, *RAC1* e *NFKB* em pacientes com AF e se o tratamento com HU influencia nos níveis de expressão genica dos genes.

6. CONCLUSÕES

- A análise dos dados hematológicos entre os pacientes com e sem uso de HU demonstrou um aumento significativo nos valores de VCM e HCM, uma diminuição na quantidade de leucócitos, HbS, LDH, BT, BD e Ferro aumentado nos pacientes que faziam uso deste fármaco, quanto aos níveis de HbF, verificamos que os pacientes que possuíam os maiores níveis de HbF (>25%) apresentaram um aumento de VCM, HCM, redução de leucócitos, neutrófilos e marcadores de hemólise.

- Ao avaliar a expressão dos genes *APEXI*, *POLB*, *NFKβ*; e *RAC1*, todos os genes apresentaram baixos níveis de expressão quando comparados aos indivíduos saudáveis.

- Ao associar a expressão do gene quanto ao tratamento com HU e a dose utilizada na terapia, podemos constatar que a terapia com o HU influencia no aumento da expressão dos genes estudados, e pacientes sem o uso do HU apresentam os menores níveis de expressão dos genes *APEXI* significativamente estatístico, quando comparado ao controle e *RAC1* quando comparado ao grupo em uso do fármaco e ao controle. Referente a influência da dose da HU nas expressões gênicas verificamos que pacientes sem o uso do HU apresentaram os menores níveis da expressão de *RAC1* e *POLB*, e a maior expressão do gene *POLB* está entre os pacientes AF tratados com as maiores doses do fármaco.

- A associação dos níveis de expressão dos genes *APEXI*; *POLB*; *RAC1* e *NFκβ* em pacientes com AF em relação aos níveis de HbF nos revelou que os pacientes que apresentaram os menores níveis de HbF, apresentam também os maiores níveis de expressão do gene *RAC1*, e pacientes que apresentam níveis de HbF entre 15-25% demonstram os menores níveis de expressão do gene *NFKB*.

- Observamos correlações positivas entre os genes envolvidos na via de reparo o *POLB* com os genes relacionados a produção de estresse oxidativo e a processos inflamatórios, *POLB* e *RAC 1* ($p < 0,001$, $R = 0,1760$), *NFKB* e *POLB* ($p < 0,001$ e $R = 0,1809$) e *NFKB* e *RAC1* ($P < 0,001$ e $R = 0,1730$).

REFERÊNCIAS

- ALLISON A. C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. **Br Med J**. v. 6, n. 1(4857): p. 290-294, 1954.
- ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**. v. 151, p. 839–845, 2000.
- ABID MR.; TSAI, J. C.; SPOCKES, K. C.; DESHPANDE, S. S.; K. IRANI; AIRD, W. C. Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism, **Faseb Journal**, v. 15, p. 2548-2550, 2001.
- AGUIAR, L.; MATOS, A.; GIL, A.; AFONSO, C.; ALMEIDA, S.; BRAGA, L.; LAVINHA, J.; KJOLLERSTROM, P.; FAUSTINO, P.; BICHO, M.; INÁCIO, A. Sickle cell anemia- Nitric oxide related genetic modifiers of hematological and biochemical parameters. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 64, n. 4, p. 957-963, 2016.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.70, p.78-86, 2018.
- AKINGBOLA T. S.; BAMIDELE, T.; CHINEDU, A. E.; OMOWUNMI, S.; SANTOSH L. S.; LEWIS L. H.; JIN, H.; RICHARD S. C.; VICTOR R. G. Maximum Tolerated Dose Versus Fixed Low-Dose Hydroxyurea for Treatment of Adults with Sickle Cell Anemia - Retrospective Comparison of Two Studies. **Blood**. p.132-3656, 2018.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**. v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BHAKAT, K. K.; MANTHA, A. K.; MITRA, S. Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein. **Antioxid Redox Signal**. v. 11, p. 621–638, 2009.
- BREWIN, J.; TEWARI, S.; MENZEL, S.; KIRKHAM, F.; INUSA, B.; RENNEY, G.; REES, D. C. The effects of hydroxycarbamide on the plasma proteome of children with sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**. 2019.
- BRUNSON, A.; KEEGAN, T. H. M.; BANG, H.; MAHAJAN, A.; PAULUKONIS, S.; WUN, T. Increased risk of leukemia among sickle cell disease patients in California. **Blood**. v. 130, n. 13, p. 1597–1599, 2017.
- CAROLINA M. BERRA; CARLOS F. M. MENCK. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quimica Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- CHARACHE, S. *et al.* Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia [see comments]. **Blood**. v. 79, n. 10, p. 2555-2565, 1992.
- COATES, T. D.; WOOD, J. C. How we manage iron overload in sickle cell patients. **British Journal of Haematology**. v. 177, n. 5, p. 703–716, 2017.

- COKIC, V. P.; BELESLIN-COKIC, B. B.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea increases eNOS protein levels through inhibition of proteasome activity. **Nitric Oxide**. v. 16; n. 3, p. 371–378, 2007.
- CROWE, S.E., Regulation of Rac1 and Reactive Oxygen Species Production in Response to Infection of Gastrointestinal Epithelia. **PLoS Pathog**. v. 12, n. 1, 2016.
- DA GUARDA, C. C.; SANTIAGO, R. P.; PITANGA, T. N.; SANTANA, S. S.; ZANETTE, D. L.; BORGES, V. M.; GONCALVES, M. S. Heme changes HIF- α , eNOS and nitrite production in HUVECs after simvastatin, HU, and ascorbic acid therapies. **Microvasc. Research**. v. 106. p. 128-36, 2016.
- DEMPLE, B.; HARRISON, L. Reparo do dano oxidativo ao DNA: enzimologia e biologia . **Annual Reviel Biochemistry**. v. 63. p. 915-948. 1994.
- DI MASI, A. Repair Mechanisms . Reference Module in Life Sciences , 2017. disease. **Clinical Hemorheol Microcirc**. v. 68, n. 2-3, p. 223-237. 2018.
- DRUMMOND, G. R.; SELEMIDIS, S.; GRIENGLING, K. K.; SOBEY, C. G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 10, n. 6, p. 453–471, 2011.
- ESTEPP, J. H.; SMELTZER, M. P.; KANG, G.; LI, C.; WANG, W. C.; ABRAMS, C.; GEORGE, A.; PUSHKARAN, S.; KONSTANTINIDIS, D.; KOOCHAKI, S.; MALIK, P.; MOHANDAS, N.; ZHENG Y.; JOINER C.; KALFA T. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. **Blood**. v. 121, p. 2099-2107, 2013.
- ESTEPP, JEREMIE H. et al. A clinically meaningful fetal hemoglobin threshold for children with sickle cell anemia during hydroxyurea therapy. **American journal of hematology**, v. 92, n. 12, p. 1333-1339, 2017.
- GEORGE, A.; PUSHKARAN, S.; LI, L.; AN, X.; ZHENG, Y.; MOHANDAS, N.; KALFA, T. A. Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: The role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 45, p. 41–45, 2010.
- GLADWIN, MT.; KATO, GJ.; WEINER, D.; ONYEKWERE, OC.; DAMPIER, C.; HSU, L.; HAGAR, RW., HOWARD, T.; NUSS, R.; OKAM, MM.; TREMONTI, CK.; BERMAN, B.; VILLELLA, A.; KRISHNAMURTI, L.; LANZKRON, S.; CASTRO, O.; GORDEUK, VR.; COLES. WA.; PETERS-LAWRENCE, M.; NICHOLS, J.; HALL, MK.; HILDESHEIM, M.; BLACKWELDER, WC.; BALDASSARRE, J.; CASELLA, JF.; DeNOVO Investigators. Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: a randomized controlled trial. **JAMA**. v. 305, n. 9, p. 893-902, 2011.
- GOU-MIN LI. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **cell Research**, v. 18, p. 85–98, 2008.
- GERCO DEN HARTOG, ET AL. Regulation of Rac1 and reactive oxygen species production in response to infection of gastrointestinal epithelia. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005382, 2016.

HANFT, VN.; STEVEN, R.; FRUCHTMAN, R.; PICKENS, CV.; WENDELL, F.; HOWARD, A.; WARE, RE. Acquired DNA mutations associated with in vivo hidroxyurea exposure. **Blood**. v. 95 p.589–593. 2000.

HARTOG, G. D.; CHATTOPADHYAY, R.; ABLACK, A.; HALL, E. H.; BUTCHER, D. L.; BHATTACHARYYA, A.; ECKMANN, L.; HARRIS, R. P.; DAS, S.; ERNST, B. P.;

HEGDE, ML.; HAZRA, T. K.; MITRA, S.; Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. **Cell Res**. v. 18, p. 27–47, 2008.

HERMANN, P. B. *et al.* Marcadores de estresse oxidativo eritrocitário em crianças com doença falciforme. **Jornal de pediatria**. v. 92, n. 4, p. 394-399, 2016.

HORDIJK, P. L. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. **Circ. Res**. v. 98, p. 453–462, 2006.

HYE-MI, LEE.; JAE-MIN, YUK.; DONG-MIN, SHI.; CHUL-SU, YANG.; KWANG-KYU, KIM.; DAE-KYOUNG, CHOI.; ZHE-LONG, LIANG.; JIN-MAN, KIM.; BYEONG, HWA. JEON CHANG, DEOK KIM; JEUNG-HOON; LEE AND, EUN-KYEONG, JO. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Is a Key Modulator of Keratinocyte Inflammatory Responses. **J Immunol**. v. 183, p. 6839-6848, 2009.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F.; LITTLE, J.A.; TAYLOR, J. 6TH.; MORRIS, C. R.; NICHOLS, J. S.; WANG, X.; POLJAKOVIC, M; MORRIS, S. M. JR.; GLADWIN, M. T. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**. v. 107, p. 2279-85. 2006.

KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal of Hematology**. v. 84, n. 9, p. 618–625. 2009.

KATO, J. G.; PIEL, B. F.; REID, D. C.; GASTON, H. M.; OHENE-FREMPONG, K.; KRISHNAMURTI, L.; WALLY, R.; SMITH, R. W.; PANEPINTO, A. J.; WEATHERALL, J. D.; COSTA, F. F.; VICHINSKY, P. E. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 4, n. 18010, 2018.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, v. 27, p. 247–254, 2001.

KIM-SHAPIRO, D. B.; GLADWIN, M. T. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell KINNEY, T. R. *et al.* Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. **Blood**, v. 94, n. 5, p. 1550-1554, 1999.

KOÇ, A. *et al.* Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 1, p. 223-230, 2004.

KROKAN, H. E.; BJORAS, M. Base Excision Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, p. 12583, 2013.

JIT, B. P.; MOHANTY, P. K.; PUROHIT, P.; DAS, K.; PATEL, S.; MEHER, S.; MOHANTY,

J. R.; SINHA S.; BEHERA K R.; DAS, P. Association of fetal hemoglobin level with frequency of acute pain episodes in sickle cell disease (HbS-only phenotype) patients. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 75, p. 30–34, 2019.

LAURENTINO, M. R. *et al.* Methemoglobin measure in adult patients with sickle-cell anemia: influence of hydroxyurea therapy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 3, p. 184-188, 2014.

LAZZARETTI, L. L. *et al.* Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *Journal of the National Medical Association*, v. 100, n. 8, p. 897-902, 2008.

LI, M.; WILSON, DM. III. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. **Antioxid Redox Signal**. v. 20 p.678–707. 2014.

LIMA, P. D. L.; CARDOSO, P. C. S.; KHAYAAT, AS.; BAHIA, M. O.; BURBANO, R. R. Evaluation of the mutagenic activity of hidroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: An in vitro study. **Genet Mol Res**. v. 2, p. 328–333, 2003.

LOGGETTO, S. R.; PELLEGRINI-BRAGA, J. A.; COSTA-CARVALHO, B. T.; SOLÉ, D. Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme. **Rev Bras Alerg Imunopatol**. v. 22, p. 77-82, 1999.

LONERGAN, G. J.; CLINE, D. B.; ABBONDANZO, S. L. Sickle Cell Anemia. **RadioGraphics**. v. 21, p. 971–994, 2001.

LUKOSZ, M.; JAKOB, S.; BÜCHNER, N.; ZSCHAUER, T.-C.; ALTSCHMIED, J.; HAENDELER, J. Nuclear Redox Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 12, n. 6, p. 713–742. 2010.

MAIA FILHO, P. A.; PEREIRA, J. F.; ALMEIDA FILHO T. P.; CAVALCANTI, B. C.; SOUSA, C. J.; LEMES, RPG. Is Chronic Use of Hydroxyurea Safe for Patients With Sickle Cell Anemia? An account of genotoxicity and mutagenicity. **Environmental and molecular mutagenesis**. v. 60, n. 3, 2019.

MARTINS, P.; ROBERTO, J.; MORAES-SOUZA, H.; SILVEIRA, T. B. Morbimortalidade em doença falciforme. **Rev bras hematol hemoter**, v. 32, n. 5, p. 378-83, 2010.

MARTEIJN J. A.; HANNES, LANS; WIM, VERMEULEN.; JAN, H. J. HOEIJMAKERS. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature Rev Mol Cell Biology**. v. 15, p. 465–481, 2014.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**. v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2015.

MICHITAKA, OZAKI; SEIICHI, SUZUKI; and KAIKOBAD, IRANI.; Redox factor-1/APE suppresses oxidative stress by inhibiting the rac1 GTPase. **FASEB j**. v. 23., 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. [http:// bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_deve_saber_sobre_heranca.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_deve_saber_sobre_heranca.pdf), 2014.

MINNITI, CP.; GORBACH, AM.; XU, D.; HON, YY.; DELANEY, KM.,; SEIDEL, M.;

MALIK, N.; PETERS – LAWRENCE, M.; CANTILENA, C.; NICHOLS, JS.; MENDELSON, L.; CONREY, A.; GRIMES, G.; KATO, GJ. Topical sodium nitrite for chronic leg ulcers in patients with sickle cell anaemia: a phase 1 dose - finding safety and tolerability trial. **Lancet Haematol.** v. 1, n. 3, p. 95-103. 2014.

NICKSON, C. M.; PARSONS, J. L. Monitoring regulation of DNA repair activities of cultured cells in-gel using the comet assay. **Frontiers in genetics.** v. 5, p. 232. 2014.

OZAKI, M.; SUZUKI, S.; IRANI, K. Redox factor-1/APE suppresses oxidative stress by inhibiting the rac1 GTPase. **The FASEB Journal.** v. 16, n. 8, p. 889–890, 2002.

PECKER, L. H.; LITTLE, J. Clinical Manifestations of Sickle Cell Disease Across the Lifespan. **Sickle Cell Disease and Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** p. 3–39, 2017.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine.** v. 16 n. 376, p. 1561–1573, 2017.

PEI, D. S.; JIA, P. P.; LUO, J. J.; LIU, W.; STRAUSS, P.R. AP endonuclease 1 (Apex1) influences brain development linking oxidative stress and DNA repair. **Cell Death Dis.** v. 10, n. 5, p. 348, 2019.

PICCIN, A.; MURPHY, C.; EAKINS, E.; RONDINELLI, M.; DAVES, M.; VECCHIATO, C.; WOLF, D.; MAHON, M. C.; SMITH, O. P. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. *European journal of haematology*, v. 102, n. 4, p. 319-330, 2019

RAMANA, C.V.; BOLDOGH, I.; IZUMI, T.; MITRA, S. Ativação de endonucleases apurínicas / apirimidínicas em células humanas por espécies reativas de oxigênio e sua correlação com a resposta adaptativa à genotoxicidade de radicais livres. **PNAS.** v. 95. n. 9. p. 5061-5066. 1998.

ROCHA *et al.*, DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB*S haplotype. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** v. 749, Issues 1–2, p. 48-52, 2012.

RODWELL, VW. In Harper's biochemistry. Appleto and Lange. **Stamford.** v. 25, p. 63-73, 2000.

GROSCH, S.; FRITZ, G.; KAINA, B.; Apurinic Endonuclease (Ref-1) Is Induced in Mammalian Cells by Oxidative Stress and Involved in Clastogenic Adaptation. **American Association for Cancer Research.** v. 58, Issue 19, p. 4410-4416, 1998.

SAKANO, K. *et al.* Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. **Jpn J Cancer Res.** v. 92. n. 11. p. 1.166-1.174. 2001.

SANT'ANA, P. G. DOS S.; ARAUJO, A. M.; PIMENTA, C. T.; BEZERRA, M. L. P. K.; JUNIOR, S. P. B.; NETO, V. M.; PINHEIRO, M. DE B. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Rev. Bras. Hematol Hemoter.** p. 39, n. 1, p. 40–45, 2017.

SERJEANT, GR. Sickle cell disease. **Lancet.** v. 350, p. 725-730, 1997.

SEBASTIANI, P.; NOLAN, V.G.; BALDWIN, C.T. et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, p. 2727-2735, 2007.

SHAH, F.; LOGSDON, D.; MESSMANN, A. R.; FEHRENBACHER C. J.; FISHEL L. M. ANDKELLEY, R. M. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. **npj Precision Onco.** v. 1, n. 19, 2017.

SILVA-PINTO, A. C. *et al.* Clinical and hematological effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients: a single-center experience in Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 4, p. 238-243, 2013.

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 364, n. 944, p. 1343-60, 2004.

STYPULKOWSKI, J. B.; MANFREDINI, V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Rev. bras. hematol. Hemoter.** v. 32, n. 1, 2010.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v.14. p. 263-292, 2018.

TELL, G.; FANTINI, D.; QUADRIFOGLIO, F.; Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 67, p. 3589–3608, 2010.

TELL, G.; QUADRIFOGLIO, F.; TIRIBELLI, C.; KELLEY, M. R. The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 11, p. 601–619, 2009.

THAKUR, S.; SARKAR, B.; CHOLIA, P. R.; GAUTAM, N.; DHIMAN, M.; MANTHA K. A. APE1/Ref-1 as an emerging therapeutic target for various human diseases: phytochemical modulation of its functions. **EMM**. v. 46, p. 106, 2014.

THEIN, M. S.; IGBINWEKA, N. E.; THEIN, S. L. Sickle cell disease in the older adult. *Pathology*. **j.pathol**. v. 49, p. 1–9, 2017.

VICARI, P.; BARRETTO DE MELLO, A.; FIGUEIREDO, M. S. Effects of hydroxyurea in a population of Brazilian patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**. v. 78, p. 243–244, 2005.

VOSKARIDOU, E. *et al.* The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). **Blood**. v. 115, n. 12, p. 2354-2363, 2010.

WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, v.115, n.26, p. 5300–5311, 2010.

WHITAKER, A.M.; SCHAICH, M.A.; SMITH, M.S.; FLYNN, T.S.; FREUDENTHAL, B. D. Correção da excisão de base do dano oxidativo ao DNA: do mecanismo à doença. *Frente Biosci (Landmark Ed)*. v. 22, p. 1493-1522, 2017.

WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annual Review of**

Genomics and Human Genetics. v. 19, n. 1, 2018.

WONG, T.E.; BRANDO, A. M.; LIM, W.; LOTTENBERG, R. Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. **Blood.** v. 124. n. 26. p. 3850-7, 2014.

WOOD, K. C.; HEBBEL, R. P.; GRANGER, D. N.; Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. **Faseb J.** v. 19, p. 989-991.2005.

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

ZAKY, A.; BOUALI-BENAZZOUZ, R.; FAVEREAUX, A.; TELL, G.; LANDRY, M. APE1/Ref-1 redox function contributes to inflammatory pain sensitization. **Experimental Neurology.** v. 307, p. 1–11, 2018.

ZIMMERMAN, S. A. *et al.* Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood.** v. 103, n. 6, p. 2039-2045, 2004.



APÊNDICE A – TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “**EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DNA E FUNÇÃO REDOX EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**”, que tem como objetivo principal é avaliar a influência da expressão de genes de reparo de fita simples e função Redox na clínica de 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 2 (duas) amostra de sangue 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 Lemes, 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 COMITÊ DE ÉTICA

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE

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

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DE DNA E REDOX EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99341118.5.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.089.093

Apresentação do Projeto:

Este é um projeto de dissertação de mestrado de Jamilly Florencio Perreira com orientação da Professora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

O estudo parte da hipótese de que há associação entre a expressão do gene APEX1 e as alterações clínicas como a vaso oclusão e o tratamento em pacientes com Anemia Falciforme.

Participarão do estudo 150 indivíduos com diagnóstico de AF acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídio. Essa amostragem corresponde a aproximadamente 70% dos pacientes com cadastro ativo na referida instituição. Os pacientes serão estratificados quanto ao tratamento com HU: grupo SS (pacientes não tratados com HU) e grupo SSHU (pacientes tratados com HU na dose de 20-30mg/kg/dia). Um grupo controle (n=50) será formado por indivíduos de ambos os sexos, doadores voluntários de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), totalizando 200 participantes. Serão coletadas amostras de sangue periférico de todos os participantes do estudo (controle e teste), a coleta de sangue dos indivíduos portadores de Anemia Falciforme será realizada no ambulatório de

hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio e a do grupo controle (HbAA) (indivíduos saudáveis) será realizada no HEMOCE. Os experimentos serão realizados no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) onde serão todos os testes moleculares. O cronograma prevê coleta de dados no período de outubro de 2018 a março de 2019, a pesquisadora declara que a coleta dos dados só terá início após aprovação do protocolo pelo CEP. O orçamento é de R\$ 8.258,00 pelos quais a pesquisadora se responsabiliza afirmando que todo o material se encontra disponível para o estudo, no laboratório do qual é pesquisadora.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Avaliar a expressão do gene de APEX1, PolB, NF; Hif-1, VEGF e RAC1 em pacientes com anemia falciforme (AF).

Objetivos específicos:

- Determinar o perfil da população em estudo quanto a idade, sexo, parâmetros clínicos e hematológicos.
- Avaliar a expressão do gene APEX1, PolB, NF; Hif-1, VEGF e RAC1 por PCR em tempo real (qPCR) em pacientes com Anemia Falciforme (HbSS) e indivíduos controles (HbAA).
- Avaliar a associação da expressão dos genes APEX; POL; RAC1; NF; Hif-1 e VEGF com as manifestações clínicas dos pacientes AF.
- Avaliar a expressão do gene quanto a resposta ao tratamento e sobrevida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora descreveu no projeto:

- Riscos da pesquisa aos participantes: A participação na pesquisa, não irá expor o participante 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.
- Benefícios da pesquisa aos participantes: Melhor avaliação da fisiopatologia da Anemia Falciforme, descobertas de marcadores moleculares e alvos terapêuticos importantes para os pacientes portadores de AF.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa factível e apresenta valor científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Toda a documentação obrigatória foi apresentada e está adequada.

*anexou os currículos das pesquisadoras.

Recomendações:

Sem recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as pendências postas por este CEP/HUWC, o protocolo se encontra adequado do ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar relatório após o término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1218520.pdf	09/11/2018 15:07:12		Aceito
Outros	CARTA_DE_ESCLARECIMENTO_DA_FINALIDADE_DO_PROJETO_APEX1.p	09/11/2018 15:05:19	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_APEX1_ROMELIA_PINHEIRO_GONCALVES_LEMES.pdf	09/11/2018 01:22:47	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Jamilly_Florencio Pereira.pdf	31/10/2018 14:37:27	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	Curriculos_Lattes_Juliana_Cordeiro_de_Sousa.pdf	31/10/2018 14:37:06	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	Curriculos_Lattes_Romelia_Pinheiro_Goncalves_Lemes.pdf	31/10/2018 14:36:20	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_controle.docx	31/10/2018 13:46:05	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_af.docx	31/10/2018 13:44:29	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Outros	Carta_de_Encaminhamento_ao_comite_de_etica_e_pesquisa_do_hospital_huwc.docx	25/09/2018 12:40:01	MARTA MIRIAM DO NASCIMENTO GONCALVES	Aceito
Outros	autorizacao_da_chefia_onde_ser_realizada_a_pesquisa.pdf	14/09/2018 17:05:32	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	declaracao_de_fiel_depositario_setor_d_e_arquivo_medico.pdf	14/09/2018 17:03:55	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	carta_de_solicitacao_de_apreciacao_de_projeto_ao_comite_de_etica_em_pesquisa_da_universidade_federal_do_c	14/09/2018 17:01:06	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito

Outros	eara_cep_ufc_propesq.pdf	14/09/2018 17:01:06	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	declaracao_de_concordancia.pdf	14/09/2018 16:58:06	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_de_prontuarios_medicos.pdf	14/09/2018 16:57:01	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Outros	carta_de_encaminhamento_ao_comite_de_etica_e_pesquisa_do_hospital_universitario_walter_cantidio.pdf	14/09/2018 16:55:02	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES	Aceito
Outros	carta_de_anuencia.pdf	14/09/2018 16:52:23	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Orçamento	declaracao_de_orcamento.pdf	14/09/2018 16:49:16	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Cronograma	declaracao_do_cronograma.pdf	14/09/2018 16:48:49	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_para_pesquisa_envolvendo_seres_humanos.pdf	14/09/2018 16:47:10	ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA,

17 de dezembro de 2018

Assinado por:
**Maria de Fatima de Souza
(Coordenador(a))**