



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

ALANO MARTINS PEDROSA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS À HIPÓXIA EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO
COM HIDROXIURÉIA

FORTALEZA

2020

ALANO MARTINS PEDROSA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS À HIPÓXIA EM PACIENTES
COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO
COM HIDROXIURÉIA

Tese apresentada para apreciação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

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

FORTALEZA

2020

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)

- P414a Pedrosa, Alano Martins.
 Análise da expressão de genes responsivos à hipóxia em pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia / Alano Martins Pedrosa. – 2020. 187 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2020.
 Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
1. Hipóxia. 2. Anemia falciforme. 3. Hidroxiuréia. 4. Reparo do DNA. 5. Angiogênese. I. Título.

CDD 615

ALANO MARTINS PEDROSA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS À HIPÓXIA EM PACIENTES
COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO
COM HIDROXIURÉIA

Tese apresentada para apreciação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 10 / 08 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof.^a Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof.^a Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meus pais, Wilson e Marucy.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e torcida de sempre. O fundamento de todo e melhor conhecimento, e essência de quem sou, aprendi com vocês. O meu pilar... são vocês!!

À Professora Dra. Romélia Gonçalves Pinheiro Lemes, minha orientadora, pelo acolhimento, conselhos e auxílio na superação dos desafios e lutas. Parceria e amizade que terá continuidade.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, pelo companheirismo, cumplicidade e confidências. Suzzy Dantas, você é uma pessoa ímpar e de um coração e generosidade raros.

Aos amigos da Comunidade Recado e que a vida me deu, especialmente Zenith Gurgel, Najla Suyan e Maru, pelo apoio, compreensão, suporte e ânimo em tantos momentos, e não foram poucos!

Aos nobres professores, participantes da banca examinadora, pelo tempo investido neste estudo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos funcionários do HEMOCE e HUWC/UFC, pela presteza e disponibilidade na realização da captação e coleta de dados e amostras de pacientes.

Por fim, meu muito obrigado a todos os pacientes que gentilmente acreditaram neste trabalho e também 'deram o seu sangue' para a concretização do mesmo.

“Desistir?

Eu já pensei seriamente nisso,
mas nunca me levei realmente a sério.
É que tem mais chão nos meus olhos
do que o cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos,
do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração
do que medo na minha cabeça.”

(Geraldo Eustáquio de Souza).

RESUMO

Hipóxia e polimerização da hemoglobina S (HbSS) são os dois gatilhos cardiais responsáveis tanto pela iniciação da falcização dos eritrócitos, como pelo desencadeamento de todos os eventos clínicos da anemia falciforme (AF), dos quais muitos aspectos fisiopatológicos e moleculares permanecem não elucidados. Apesar de ser uma característica permanente na AF, ainda não há um consenso sobre a definição ou manejo da hipóxia em pacientes falciformes, e faltam estudos sobre o seu papel nos mecanismos patogênicos da doença, ou como ela influencia as complicações clínicas ou o tratamento com a hidroxiúria (HU), padrão-ouro no tratamento da AF. Destarte, o presente estudo propôs investigar a expressão de genes responsivos à sinalização de hipóxia na AF e a possível relação dose-efeito com a HU em marcadores de angiogênese, danos e reparos ao DNA e clínico-laboratoriais. A população de estudo foi constituída por 97 pacientes com AF, em tratamento ou não com HU, de ambos os sexos e com idade variando de 18 a 68 anos. Os indivíduos foram estratificados em dois grupos: Grupo SS (sem uso de HU, n=29) e grupo SSHU (em uso de HU, n=68). O grupo SSHU fora ainda estratificado em subgrupos de acordo com a dose diária do medicamento em uso: SSHU-0,5g (n = 13); SSHU-1g (n = 40) e SSHU- \geq 1,5g (n =15). Um grupo controle foi formado por 73 indivíduos saudáveis, doadores voluntários de sangue. A expressão de mRNA dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* foi mensurada por qPCR e associada às características clínicas e laboratoriais dos pacientes, bem como à dose diária do medicamento administrado. Dentre os resultados principais, observou-se uma superexpressão de todos os genes responsivos à hipóxia aqui investigados ($p < 0,01$), quando comparados pacientes e indivíduos saudáveis, e uma significativa associação entre a concentração de Hb F e os genes em estudo. Os genes *ATM* e *ATR* foram associados aos eventos de cardiopatia (*ATM*, $p < 0,01$, e *ATR*, $p = 0,048$) e úlcera nas pernas (*ATM*, $p = 0,048$), e foi identificada associação significativa entre a variável quantidade de episódios de dor e expressão de *VEGF* e *ATM*. Indivíduos em tratamento com HU demonstraram redução na expressão de *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* em relação aos sem tratamento. A expressão gênica dos pacientes em tratamento evidenciou uma relação dose-efeito, na qual se observou que indivíduos do grupo SSHU-0,5g demonstraram significativo aumento de expressão de *HIF-1 α* e *VEGF* em relação os indivíduos SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g. Pacientes SSHU-1g apresentaram redução significativa da expressão do gene *ATM* em comparação aos pacientes SSHU-0,5g e do gene *ATR* em referência tanto aos indivíduos SSHU-0,5g e SSHU- \geq 1,5g. Os resultados do presente estudo evidenciam que o estresse hipóxico e sua ingerência na expressão gênica podem estar envolvidos tanto na gravidade quanto no tratamento da AF. Os resultados sugerem ainda que os genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* atuam através de mecanismos em conjunto, tendo em vista as correlações obtidas, e que a HU exerce uma notável e importante relação dose-efeito com os genes supracitados. Até o momento, este é o primeiro estudo que investiga a relação dos genes concernentes aos mecanismos de hipóxia, angiogênese e de danos e reparos do DNA, bem como a influência destes nas características clínicas dos pacientes falciformes e sua correlação com o tratamento.

Palavras-chave: Hipóxia. Anemia falciforme. Hidroxiúria. Reparo do DNA. Angiogênese.

ABSTRACT

Hypoxia and hemoglobin S (HbSS) polymerization are the two cardinal triggers responsible for both erythrocyte sickling as well as of all clinical events in sickle cell anemia (SCA), a disease with many pathophysiological and molecular aspects that remain unclear. Despite being a permanent feature of SCA, there is still no consensus on the definition or management of hypoxia in sickle cell patients, and studies on its role in the pathogenic mechanisms of the disease, or on how it influences the clinical complications or hydroxyurea (HU) treatment, gold standard in the treatment of SCA, are lacking. Therefore, this study aimed to investigate the expression of hypoxia response genes in SCA and to analyze the dose-response to HU of angiogenesis, DNA damage and repairs, and clinical-laboratorial markers. The study population comprised 97 patients of both sexes, of ages ranging from 18 to 68 years, stratified into two groups: SS group (no HU, n=29) and SSHU group (treated with HU, n=68). The SSHU group was further stratified into subgroups according to the daily dose of the drug that patients already used: SSHU-0.5g (n=13); SSHU-1g (n=40) and SSHU- \geq 1.5g (n=15). A control group included 73 healthy individuals who were voluntary blood donors. The mRNA expression of the *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM*, and *ATR* genes was measured by qPCR and associated with clinical and laboratory characteristics of the patients as well as with the daily dose of the drug. The main results included overexpression of all hypoxia-responsive genes tested here (p<0.01) in patients compared to healthy individuals, and a significant association between the concentration of Hb F and the genes under study. The *ATM* and *ATR* genes were associated with heart disease events (*ATM*, p<0.01; *ATR*, p=0.048) and with leg ulcers (*ATM*, p=0.048), and a significant association was identified between the variable number of episodes of pain and both *VEGF* and *ATM* expression. Individuals treated with HU showed reduction in *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM*, and *ATR* expression compared to those untreated. Gene expression in the patients revealed a dose-effect relationship: individuals in the SSHU-0.5g group showed higher *HIF-1 α* and *VEGF* expression than SSHU-1g and SSHU- \geq 1.5g individuals. SSHU-1g patients showed significant reduction in *ATM* gene expression compared to SSHU-0.5g patients and of *ATR* gene expression compared to both SSHU-0.5g and SSHU- \geq 1.5g individuals. The results of the present study show that hypoxic stress and its interference in gene expression may be involved in both the severity and treatment of the SCA. The results also suggest that the *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* and *ATR* genes act through mechanisms together, in view of the correlations obtained, and that HU has a notable and important dose-effect relationship with the aforementioned genes. So far, this is the first study that investigates the relationship of genes concerning the mechanisms of hypoxia, angiogenesis and DNA damage and repair, as well as their influence on the clinical characteristics of sickle cell patients and their correlation with treatment.

Keywords: Hypoxia. Sickle cell anemia. Hydroxyurea. DNA repair. Angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Molécula globular tetramérica de hemoglobina normal	21
Figura 2	- Eritropoiese humana e a síntese de hemoglobina	21
Figura 3	- Estrutura da hemoglobina. Representação do grupo prostético heme e cadeias de globina.	23
Figura 4	- Esquema da formação da estrutura quaternária da molécula de hemoglobina	24
Figura 5	- Representação esquemática da sequência de expressão dos genes nos <i>clusters</i> α - e β -globinas dos cromossomos 11 e 16	26
Figura 6	- Ontogenia das hemoglobinas	27
Figura 7	- Distribuição global de recém-nascidos com anemia falciforme	33
Figura 8	- Alteração genética na cadeia β -globina da molécula de hemoglobina que origina a hemoglobina variante S.....	40
Figura 9	- Diagrama ilustrando a cascata de eventos fisiopatológicos derivados da polimerização da deoxi-Hb S	43
Figura 10	- Complicações clínicas da anemia falciforme responsáveis pelas principais hospitalizações do paciente	47
Figura 11	- Genes ativados transcricionalmente pelo <i>HIF-1α</i>	51
Figura 12	- Esquema da regulação transcricional do <i>HIF-1α</i> em condições de normóxia e hipóxia	53
Figura 13	- Mecanismo de ação envolvendo os efeitos benéficos da Hidroxiuréia na anemia falciforme	69
Figura 14	- Vias da fisiopatologia da anemia falciforme e oportunidades para a terapia direcionada ...	75
Figura 15	- Abordagens terapêuticas para a anemia falciforme, baseadas em sua fisiopatologia	79
Figura 16	- Fluxograma de delineamento de estudo	88
Figura 17	- Rede de associações entre morte, complicações clínicas e achados laboratoriais na doença falciforme	102
Figura 18	- Critérios de escores e classificação fenotípica da doença falciforme pela Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme	103
Figura 19	- Representação gráfica da expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> de pacientes com anemia falciforme <i>versus</i> indivíduos saudáveis	113
Figura 20	- Frequência de quantidade de episódios de dor relatada pelos pacientes do estudo	122
Figura 21	- Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, tratados ou não com hidroxiuréia e grupo controle	124
Figura 22	- Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, tratados ou não com hidroxiuréia ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	126

Figura 23	- Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	138
Figura 24	- Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia e sem tratamento	140
Figura 25	- Expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> em indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia e sem tratamento	142
Figura 26	- Análise de correlação dos níveis de expressão do gene <i>HIF-1α</i> e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme	145
Figura 27	- Análise de correlação dos níveis de expressão do gene <i>VEGF</i> e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme	146
Figura 28	- Análise de correlação dos níveis de expressão do gene <i>ATM</i> e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme	147
Figura 29	- Análise de correlação dos níveis de expressão do gene <i>ATR</i> e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme	148

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	- Hemoglobinas normais no desenvolvimento humano	28
Tabela 2	- Agentes farmacológicos antifalcização, indutores de hemoglobina fetal e anti-inflamatórios	81
Tabela 3	- Agentes farmacológicos antiadesão, antioxidantes e moduladores de danos de isquemia-reperfusão	82
Tabela 4	- Agentes farmacológicos antiplaquetários, anticoagulantes e órgãos-específicos	83
Tabela 5	- Genes utilizados na avaliação da expressão gênica por qPCR em tempo real	97
Tabela 6	- Caracterização descritiva das variáveis demográficas dos indivíduos do estudo	106
Tabela 7	- Caracterização descritiva do perfil hematológico e bioquímico dos indivíduos do estudo.	107
Tabela 8	- Distribuição de frequências de complicações clínicas e comorbidades em história progressa ou não	108
Tabela 9	- Distribuição de frequências das variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões e internações	109
Tabela 10	- Distribuição de frequência fenotípica de risco de morte dos indivíduos do estudo	110
Tabela 11	- Caracterização dos pacientes com anemia falciforme, quanto ao tratamento	111
Tabela 12	- Expressão gênica de <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> em pacientes com anemia falciforme .	112
Tabela 13	- Cruzamento da expressão de genes relacionados à hipóxia e particularidades demográficas e clínicas de pacientes com anemia falciforme	114
Tabela 14	- Associação da expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> com principais comorbidades e intercorrências clínicas de pacientes com anemia falciforme	115
Tabela 15	- Associação da expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> com principais manifestações/complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme	116
Tabela 16	- Expressão gênica e variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões sanguíneas e internações de pacientes falciformes	117
Tabela 17	- Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes falciformes <i>versus</i> expressão gênica	118
Tabela 18	- Caracterização demográfica e laboratorial de pacientes falciformes, em terapia ou não com hidroxiuréia	119
Tabela 19	- Frequência das complicações clínicas e comorbidades em pacientes falciformes, em terapia ou não com hidroxiuréia	120

Tabela 20	- Frequência das variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões e internações dos pacientes falciformes, em terapia ou não com hidroxiuréia	121
Tabela 21	- Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes com anemia falciforme <i>versus</i> uso e não uso de hidroxiuréia	122
Tabela 22	- Concentração de hemoglobina fetal de pacientes com anemia falciforme <i>versus</i> uso e não uso de hidroxiuréia	123
Tabela 23	- Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia, e indivíduos saudáveis ($2^{-\Delta Cq}$)	124
Tabela 24	- Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, quanto ao uso ou não de hidroxiuréia ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	125
Tabela 25	- Associação da expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> com variáveis demográficas de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia...	127
Tabela 26	- Associação da expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> com principais características clínicas e comorbidades de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia	128
Tabela 27	- Associação da expressão dos genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i> com variáveis relacionadas às crises álgicas e internações hospitalares de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia	130
Tabela 28	- Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia, <i>versus</i> expressão gênica	130
Tabela 29	- Associação da concentração de hemoglobina fetal de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia, com os genes <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF</i> , <i>ATM</i> e <i>ATR</i>	131
Tabela 30	- Caracterização demográfica e laboratorial de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	132
Tabela 31	- Frequência das complicações clínicas e comorbidades de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	134
Tabela 32	- Frequência das variáveis relacionadas às crises álgicas e internações hospitalares de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	135
Tabela 33	- Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	135
Tabela 34	- Concentração de hemoglobina fetal de pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	136

Tabela 35	- Correlação entre genes responsivos à hipóxia e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme	143
Tabela 36	- Classificação das correlações significativas entre a expressão gênica e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme	144
Tabela 37	- Análise de correlação entre os genes responsivos à hipóxia de pacientes com anemia falciforme	149
Quadro 1	- Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme em alguns estados brasileiros	37
Quadro 2	- Incidência de nascidos vivos diagnosticados com traço falciforme em alguns estados brasileiros	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATR	Ataxia telangiectasia e Rad3 relacionados
AVC	Acidente vascular-cerebral
BER	Reparo por excisão de bases
Cq	<i>Quantification cycle</i> (ciclo de quantificação)
CVO	Crise vaso-oclusiva
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-DSB	Quebra da dupla fita do DNA
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIH	Fator de inibição do HIF-1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
HAS	Hipertensão arterial sistólica
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A (hemoglobina normal)
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb S	Hemoglobina S (hemoglobina falciforme)
HbAS	Heterozigose para hemoglobina falciforme (traço falciforme)
HbSS	Homozigose para hemoglobina falciforme (anemia falciforme)
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMOCE	Hemocentro do Ceará
HIF	Fator induzível por hipóxia
HIF-1 α	Fator induzível por hipóxia-1-alfa

HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HR	Recombinação homóloga
HRE	Elementos responsivos à hipóxia
HU	Hidroxiuréia
HUWC	Hospital universitário Walter Cantídio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IIQ	Intervalo interquartil
LDH	Lactato desidrogenase
MMII	Membros inferiores
MMR	Reparo por erro de emparelhamento de bases (mismatch)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
ODD	Degradação dependente do oxigênio
OMS	Organização mundial de saúde
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHD	Prolil-hidroxilase
PIKK	Fosfatidilinositol 3-quinase relacionada à quinases
PNTN	Programa nacional de triagem neonatal
RN	Recém-nascidos
RNA	Ácido ribonucleico
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TMO	Transplante de medula óssea
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
vs	<i>Versus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	A hemoglobina humana	20
2.1.1	<i>Origem e função</i>	20
2.1.2	<i>Estrutura da hemoglobina</i>	22
2.1.3	<i>Expressão diferencial dos genes das globinas e fenótipo das hemoglobinas normais...</i>	25
2.1.4	<i>Hemoglobinas variantes e as hemoglobinopatias hereditárias</i>	29
2.2	Anemia falciforme	30
2.2.1	<i>Definição clássica</i>	30
2.2.2	<i>Perspectiva histórica</i>	30
2.2.3	<i>Epidemiologia- Origem e dispersão da Hb S</i>	33
2.2.4	<i>Considerações genéticas e moleculares da anemia falciforme</i>	38
2.2.5	<i>Mecanismo fisiopatológico da doença</i>	41
2.2.6	<i>Variabilidade clínica</i>	44
2.3	Hipóxia e mecanismos de gravidade na anemia falciforme	47
2.3.1	<i>O Sistema HIF</i>	50
2.3.2	<i>Hipóxia e sinalização HIF-1α na angiogênese fisiológica e patológica</i>	53
2.3.2.1	<i>VEGF no contexto da hipóxia e anemia falciforme</i>	56
2.3.3	<i>Hipóxia e instabilidade genética</i>	57
2.3.3.1	<i>Mecanismos de reparo de dano ao DNA</i>	60
2.3.3.2	<i>ATM e ATR no contexto da hipóxia e anemia falciforme</i>	61
2.4	Diagnóstico, triagem e prevenção	63
2.5	Estratégias terapêuticas	65
2.5.1	<i>Opções terapêuticas vigentes</i>	67
2.5.1.1	<i>A Hidroxiuréia, 'padrão ouro' de tratamento</i>	67
2.5.1.2	<i>Transfusão sanguínea</i>	72
2.5.1.3	<i>Transplante de células-tronco hematopoiéticas</i>	73
2.5.2	<i>Novas abordagens de tratamento e perspectivas de conduta</i>	74
2.5.2.1	<i>Terapia genética</i>	76
2.5.2.2	<i>Terapia de micronutrientes e a L-Glutamina</i>	77
2.5.2.3	<i>Abordagens farmacoterapêuticas baseadas na fisiopatologia da doença</i>	78
3	RELEVÂNCIA	84

4	OBJETIVOS	86
4.1	Objetivo geral	86
4.2	Objetivos específicos	86
5	CASUÍSTICA E MÉTODOS	87
5.1	Aspectos éticos	87
5.2	Delineamento do estudo	87
5.3	Local de realização do estudo	89
5.4	Seleção da amostra	89
5.4.1	<i>População do estudo</i>	89
5.4.2	<i>Representatividade e cálculo do tamanho amostral</i>	89
5.4.3	<i>Estratificação dos grupos de estudo</i>	90
5.4.4	<i>Crítérios de inclusão e exclusão dos participantes do estudo</i>	91
5.5	Coleta de dados	92
5.5.1	<i>Informações clínicas, laboratoriais e demográficas</i>	92
5.5.2	<i>Coleta das amostras biológicas</i>	92
5.6	Métodos experimentais	93
5.6.1	<i>Testes seletivos para investigação de perfil de hemoglobinas</i>	93
5.6.1.1	<i>Preparação de hemolisados</i>	93
5.6.1.2	<i>Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino</i>	93
5.6.1.3	<i>Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido</i>	94
5.6.1.4	<i>Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)</i>	95
5.6.2	<i>Análises de expressão gênica</i>	95
5.6.2.1	<i>Extração de RNA</i>	95
5.6.2.2	<i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	96
5.6.2.3	<i>Teste de reação em cadeia da polimerase - quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	96
5.6.3	<i>Análises de marcadores bioquímicos</i>	98
5.6.4	<i>Investigação do perfil fenotípico por escores de gravidade</i>	101
5.7	Análises estatísticas	103
6	RESULTADOS	105
6.1	Caracterização dos pacientes do estudo	105
6.1.1	Análises da expressão de genes relacionados à hipóxia em pacientes com anemia falciforme	111

6.2	Estratificação e caracterização dos grupos de estudo quanto ao uso de hidroxiuréia	118
6.2.1	Análises da expressão de genes relacionados à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados quanto ao uso de hidroxiuréia	123
6.3	Estudo de parâmetros e indicadores em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	132
6.3.1	Análises da expressão de genes relacionados à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia	136
6.4	Análises da correlação entre os níveis de expressão de genes relacionados aos mecanismos de hipóxia e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme	142
7	DISCUSSÃO	150
8	CONCLUSÕES	164
	REFERÊNCIAS	166
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ..	183
	APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA DE ESTUDO E ACOMPANHAMENTO DO PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME	185

1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças humanas, pode-se seguramente afirmar que a anemia falciforme (AF) trata-se de um transtorno ímpar, caracterizado por sua extraordinária heterogeneidade clínica e por distúrbios simultâneos em múltiplos órgãos, instigados via mecanismos peculiares e complexos, muitos dos quais, ainda não totalmente elucidados (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Considerada como o grande marco inicial do que conhecemos hoje como Medicina Molecular (PAULING *et al.*, 1949), a base da fisiopatologia da AF se deve à presença da hemoglobina S (Hb S, ou hemoglobina falciforme, do inglês, ‘*sickle*’), uma hemoglobina resultante de uma alteração hereditária estrutural por substituição de um aminoácido na sua cadeia globínica normal. Sob condições de baixa tensão de oxigênio (O₂), a Hb S sofre polimerização, distorcendo a forma normal bicôncava dos eritrócitos à aparência característica de uma foice, ou ‘meia lua’. Esses eritrócitos tornam-se mais rígidos e indeformáveis, passando a apresentar danos estruturais em suas membranas e comprometimento do fluxo sanguíneo pela microvasculatura. Tais alterações correspondem à etapa inicial das chamadas crises falcêmicas, representadas, principalmente, por eventos de oclusão vascular, isquemia, hipóxia tecidual e falência de tecidos e órgãos adjacentes (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; PICCIN *et al.*, 2019; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Embora oscile, temporal e espacialmente, na vida dos pacientes, a hipóxia é considerada como uma característica permanente e intermitente da doença, e reconhecida por ser tanto o gatilho promotor da falcização dos eritrócitos, como uma consequência malquista da falcização (CABOOT; ALLEN, 2014). Destarte, o ciclo de hipóxia e falcização de eritrócitos resulta em complicações bem conhecidas na AF: crises de vaso-oclusão (CVO), hemólises, acidente vascular cerebral (AVC), crises algicas, síndrome torácica aguda (STA), injúrias oxidativas, danos inflamatórios agudos e crônicos e vasculopatias (BALLAS, 2018; CARIO, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

A extensão da polimerização da Hb S é um determinante primário da gravidade da AF e é proporcional ao grau e duração da desoxigenação da hemoglobina, em virtude da hipóxia (CABOOT; ALLEN, 2014). Assim sendo, o estresse hipóxico nesses pacientes pode ser considerado como um marcador e preditor das manifestações clínicas, intercorrências, monitoramento e tratamento do paciente (HALPHEN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017). Infelizmente, ainda não há um consenso sobre a definição ou tratamento da hipóxia em pacientes com AF, e faltam estudos sobre o papel da hipóxia nos mecanismos patogênicos da doença, ou como ela

influencia o tratamento ou complicações secundárias (CABOOT; ALLEN, 2014; CHINAWA *et al.*, 2013; HALPHEN *et al.*, 2014).

Sabe-se, entretanto, que a diminuição da concentração/disponibilidade de O₂ aos tecidos, tem consequências profundas para um organismo aeróbico e pode resultar na ativação de várias respostas e mecanismos diferentes, tanto ao nível celular quanto ao nível de organismo como um todo (ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014). Essas respostas incluem mudanças drásticas na expressão gênica e produção de proteínas que permitem à célula gerenciar, eficientemente, o estresse hipóxico e promover a sua preservação e sobrevivência (MASOUD; LI, 2015; ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

Tais alterações são empreendidas com o intuito de restaurar a oxigenação ou promover a conservação de energia para as suas atividades metabólicas vitais ou propiciar a adaptação do organismo ao ambiente de hipóxia. Todavia, também podem trazer alterações deletérias e letais para a célula e organismo (KIM *et al.*, 2017; MACHOGU; MACHADO, 2018).

Evidências sugerem que hipóxia, angiogênese, inflamação crônica, estresse oxidativo e respostas celulares às mudanças na tensão de O₂ são eventos inter-relacionados e codependentes (DANESE *et al.*, 2006; ELTZSCHIG; BRATTON; COLGAN, 2014; HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; LOPES *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016). De igual forma, referem que a via de sinalização hipóxia/fator induzível por hipóxia-1-alfa (*HIF-1 α* , do inglês *hypoxia-inducible factor*) é o principal mecanismo transcricional regulador desses eventos (KIM *et al.*, 2017; MASOUD; LI, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016), que além de mediar inúmeros eventos fisiológicos e patológicos e poder influenciar no tratamento de doenças, confere à AF o título de “doença de hipóxia” (SUN; XIA, 2013, grifo nosso).

À vista do exposto, o presente trabalho tem o propósito de investigar o nexo da hipóxia e anemia falciforme, através da mensuração da expressão de genes responsivos às situações de baixas tensões e disponibilidade de oxigênio porque passam os pacientes falciformes, *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*. Delineia-se ainda associar tais achados aos mecanismos fisiopatogênicos e às peculiaridades clínicas e laboratoriais da doença e a possíveis interposições e ingerências na abordagem terapêutica de cuidado ao doente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A hemoglobina humana

2.1.1 Origem e função

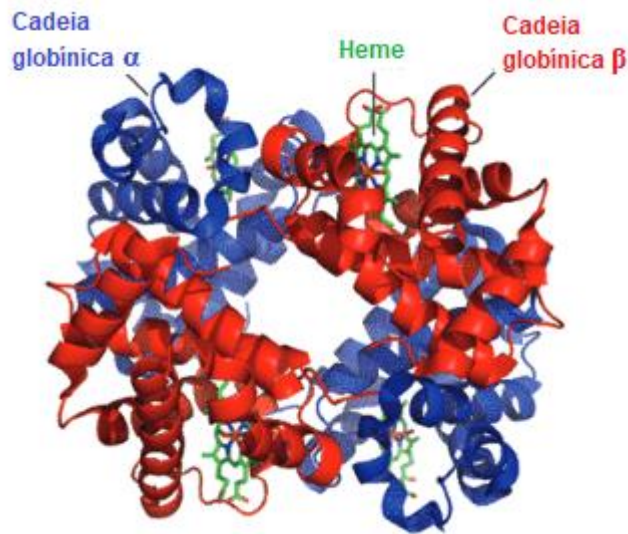
A hemácia, ou eritrócito, é o produto final das células do sistema eritropoiético de todos os vertebrados, inclusive do homem. Este sistema destina-se unicamente a produzir células apropriadas para a síntese, transporte e proteção da hemoglobina (Hb), pigmento respiratório que dá a cor vermelha ao sangue, criada, especialmente, para transportar o O₂ dos pulmões aos tecidos. A Hb interage ainda com outros gases de relevada importância biológica para a sobrevivência do organismo (LUDVIGSEN, 1998; PHILIPSEN; HARDISON, 2018).

Durante os últimos 70 anos, o estudo da Hb humana, provavelmente mais que qualquer outra molécula, permitiu o nascimento e a maturação da medicina molecular, com ampla abrangência no conhecimento de seus aspectos fisiológicos, genéticos e bioquímicos (SCHECHTER, 2008).

Considerada como sendo uma das proteínas mais generalizadas e especializadas existentes na natureza, a Hb é a principal proteína localizada no interior dos eritrócitos dos mamíferos, constituindo cerca de 98% da proteína total citoplasmática, tendo como principal função a absorção, transporte e distribuição do O₂ para os diversos órgãos e tecidos do organismo (CORDOVIL, 2018; IAROVAIA *et al.*, 2018). Além disso, em contrapartida, a Hb atua também, no transporte dos gases: monóxido de carbono (CO) e do dióxido de carbono (CO₂), fazendo o trajeto inverso - dos tecidos periféricos para os pulmões, onde são excretados. Ademais, a Hb está envolvida no equilíbrio ácido-base intraeritrocitário e sanguíneo, na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e no transporte de óxido nítrico (NO), sendo, outrossim, de extrema importância nos eventos de vasodilatação capilar, na regulação do fluxo sanguíneo e homeostase orgânica (BALLAS *et al.*, 2012; SCHECHTER, 2008).

A estrutura dos genes que codificam as subunidades da Hb, caracterizada por três exons e dois íntrons, é altamente similar entre os animais vertebrados (QUINN *et al.*, 2010), conferindo à molécula hemoglobínica uma estrutura globular tetramérica, formada por quatro subunidades constituídas de duas frações: uma proteica, que consiste nas cadeias globínicas, geneticamente determinadas, e uma parte não proteica (também chamada de prostética), constituída pelo grupo heme, sítio de ligação do átomo de O₂ (FIGURA 1) (GELL, 2018; HONIG; ADAMS, 2012; MANCA; MASALA, 2008).

Figura 1 – Molécula globular tetramérica de hemoglobina normal



Fonte: Adaptado de Claiborn (2010).

Haja vista que o transporte do O_2 é realizado graças à sua ligação reversível com o grupo heme, é mérito da fração globínica a proteção contra a oxidação e a harmonia da estrutura, tornando toda a molécula solúvel e maleável, possibilitando variações na afinidade para com o O_2 (BAIN, 2008; PEÑUELA, 2005).

A síntese da Hb é um processo complexo e constante, que decorre nas diferentes fases do desenvolvimento de um indivíduo. Tem lugar nos precursores eritróides, iniciando no estágio de proeritroblasto e finalizando na fase de reticulócito, sob controle genético de oito (08) enzimas distintas, cujas etapas de síntese situam-se tanto nas mitocôndrias, como no citoplasma celular (FIGURA 2) (BAIN, 2008; PEÑUELA, 2005).

Figura 2 – Eritropoiese humana e a síntese de hemoglobina



Fonte: Adaptado de Zivot *et al.* (2018).

Visão geral da eritropoiese, da célula-tronco hematopoiética (Stem cell) até o glóbulo vermelho (hemácia). A eritropoiese ocorre na medula óssea e as ilhas eritroblásticas são nichos para a eritropoiese da CFU-E (unidade formadora de colônia de eritroblastos) até o estágio de reticulócito, onde ganha a corrente sanguínea e atinge sua maturação. BFU-E (unidade formadora de explosão eritróide).

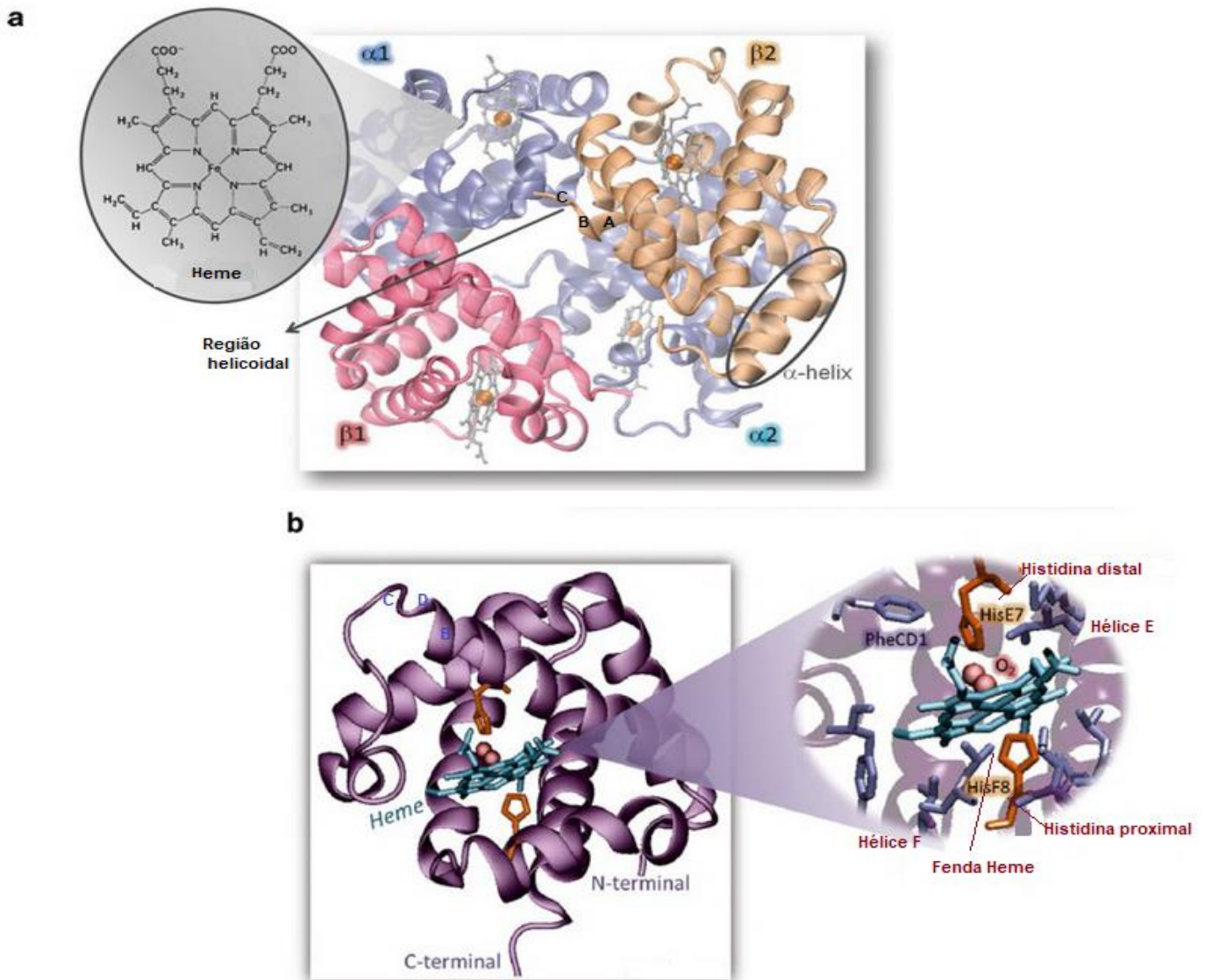
2.1.2 Estrutura da hemoglobina

As moléculas de Hb humana são um conjunto de proteínas formadas pelo emparelhamento simétrico de um dímero de cadeias polipeptídicas, as α -globinas e as β -globinas, harmoniosamente e funcionalmente estruturadas em uma unidade tetramérica (SCHECHTER, 2008). Ao se unirem, essas subunidades proteicas formam uma estrutura globular, na qual são dispostas cavidades que alojam um núcleo prostético de ferro, ligado quimicamente por forças não covalentes, que protegem o átomo de ferro do acesso da solução aquosa envolvente (GELL, 2018; PEÑUELA, 2005; SCHECHTER, 2008).

Dessa maneira, podemos descrever a estrutura molecular da Hb como sendo composta por:

- Cadeias globínicas – constituídas de dois pares de cadeias polipeptídicas, idênticas duas a duas, nos quais, um par é denominado de cadeias do tipo alfa (alfa (α) ou zeta (ζ)) e o outro de cadeias do tipo não-alfa ou beta (beta (β), delta (δ), gama (γ) ou épsilon (ϵ)).
- Grupo heme ou ferroprotoporfirina IX - constituído por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metano e ligados a um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}), responsável por unir quimicamente a estrutura da hemoglobina. Detém a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o O_2 nos tecidos (FIGURA 3) (PERUTZ *et al.*, 1960; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Figura 3 – Estrutura da hemoglobina. Representação do grupo prostético heme e cadeias de globina



Fonte: Adaptado de Jorge *et al.* (2016).

(a) Molécula de hemoglobina com grupo heme e cadeias de globina em destaque. (b) Representação da fenda onde o heme se localiza dentro da hemoglobina, indicando as histidinas proximal e distal, grupos C- e N- terminais e molécula de O₂.

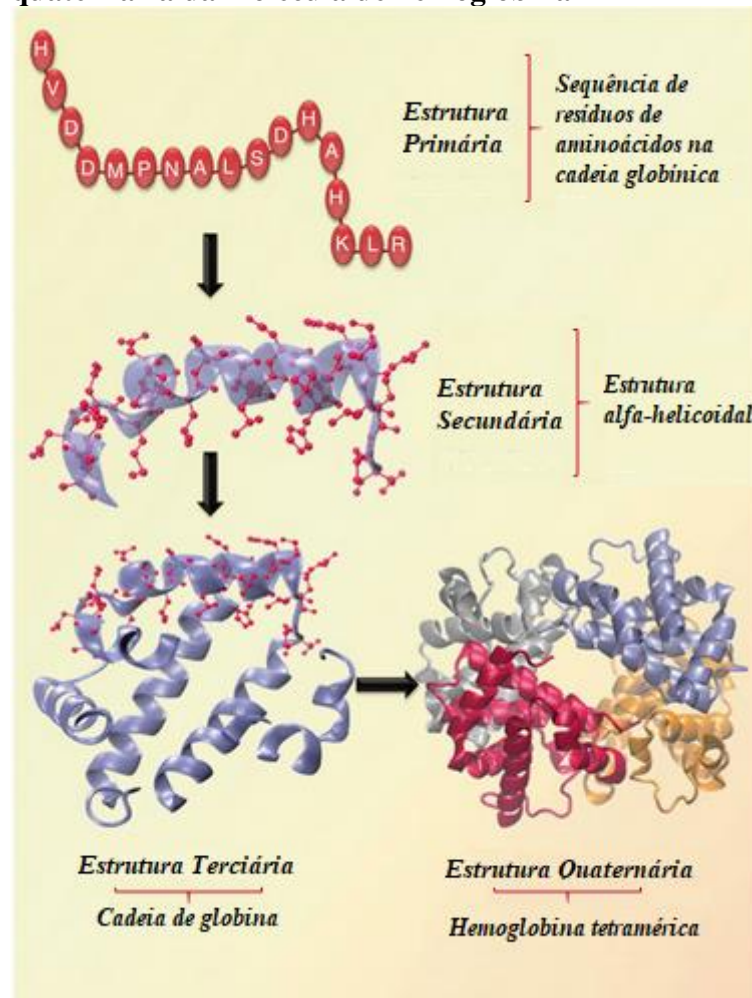
É graças à alta reatividade do ferro, e sua grande afinidade pelo O₂, que este pode ser transportado para todos os tecidos do corpo, incorporando-se em várias reações celulares e participando da produção de energia oxidativa, essencial para a manutenção da vida (BUNN; FORGET, 1986; PERUTZ *et al.*, 1960; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

Cada cadeia polipeptídica da globina é composta por uma sequência precisa de aminoácidos, apresentando, as cadeias alfas, 141 aminoácidos, enquanto as cadeias betas são formadas pelo sequenciamento de 146 aminoácidos, que se mantém completamente conservada de geração em geração (estrutura primária) (FIGURA 4). As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos, desde o

período embrionário (intrauterino) até a fase adulta, produzidas continuamente no decorrer do desenvolvimento humano (BUNN; FORGET, 1986; GELL, 2018).

A estrutura secundária é muito semelhante à primária. Como resultado da formação de ligações não-covalentes de baixa energia entre as cadeias secundárias, cada aminoácido adquire uma estrutura tridimensional, altamente específica, composta por oito segmentos helicoidais designados por letras de A-H, sete segmentos não-helicoidais (NA, AB, CD, EF, FG, GH e HC) e duas terminações N e C. Esta diferença é fundamental, pois os segmentos helicoidais são rígidos e lineares, enquanto, os não-helicoidais são flexíveis e adaptáveis. Esta conformação tridimensional (estrutura terciária) irá se amoldar em um arranjo tetramérico (estrutura quaternária), dando origem à uma molécula harmoniosamente ajustável e moldável de hemoglobina (PHILIPSEN; HARDISON, 2018; SCHECHTER, 2008).

Figura 4 – Esquema da formação da estrutura quaternária da molécula de hemoglobina



Fonte: Adaptado de Jorge *et al.* (2016).

Fragmento de uma cadeia α -globina para representar a conformação primária, secundária, terciária e quaternária da hemoglobina.

Como o ferro do heme forma uma ligação covalente com a histidina proximal (F8) e o oxigênio se une de forma não-covalente ao heme e à histidina distal (E7), o heme fica suspenso numa fenda não polar entre os helicoidais E e F, como se pode observar na figura 3b (GELL, 2018; PHILIPSEN; HARDISON, 2018; SCHECHTER, 2008).

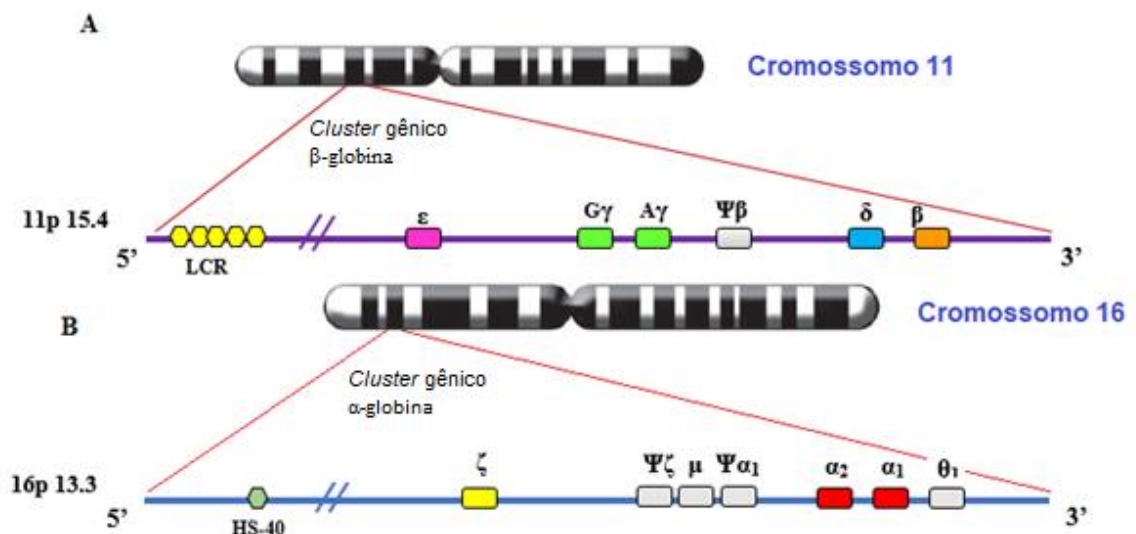
2.1.3 Expressão diferencial dos genes das globinas e fenótipo das hemoglobinas normais

A gênese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos (*clusters*) de genes que são ativados ou desativados, na ordem cronológica em que são expressos (sentido 5' → 3'), de maneira complexa, envolvendo vários mediadores moleculares a fim de estimular a produção de Hb e suprir a necessidade de O₂ (GELL, 2018; HONIG; ADAMS, 2012).

Em indivíduos normais, a síntese da α -globina é regulada por genes funcionais de globina α , localizados no segmento distal da região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3), em um segmento do ácido desoxirribonucleico (DNA-*deoxyribonucleic acid*) de 35kb (FIGURA 5). Este *cluster* contém os genes zeta (ζ), que codifica a cadeia ζ globínica, três pseudogenes, ($\psi\zeta$, $\psi\alpha 2$ e $\psi\alpha 1$), os genes alfa 1 ($\alpha 1$) e alfa 2 ($\alpha 2$), que, no ser humano, estão duplicados, devendo-se este fato provavelmente à duplicação gênica no decorrer do processo evolutivo, e um gene teta (θ), de função ainda não totalmente conhecida. Os três pseudogenes possuem mutações, não sendo por isso, expressos (CORDOVIL, 2018; VOON; VADOLAS, 2008).

No cromossomo 11, localiza-se o *cluster* dos genes beta, com uma extensão superior a 60kb, onde se observam, no sentido 5' → 3', os genes épsilon (ϵ), gama glicina (γ^G), gama adenina (γ^A), um pseudogene ($\psi\beta$) e os genes delta (δ) e beta (β) (FIGURA 5) (CORDOVIL, 2018; VOON; VADOLAS, 2008).

Figura 5 – Representação esquemática da sequência de expressão dos genes nos *clusters* α - e β -globinas dos cromossomos 11 e 16



Fonte: Representação gráfica de autoria própria. Referenciado de: Frenette e Atweh (2007); Galiza Neto e Pitombeira (2003).

Esquema A: *Cluster* β -globina no cromossomo 11.

Esquema B: *Cluster* α -globina no cromossomo 16.

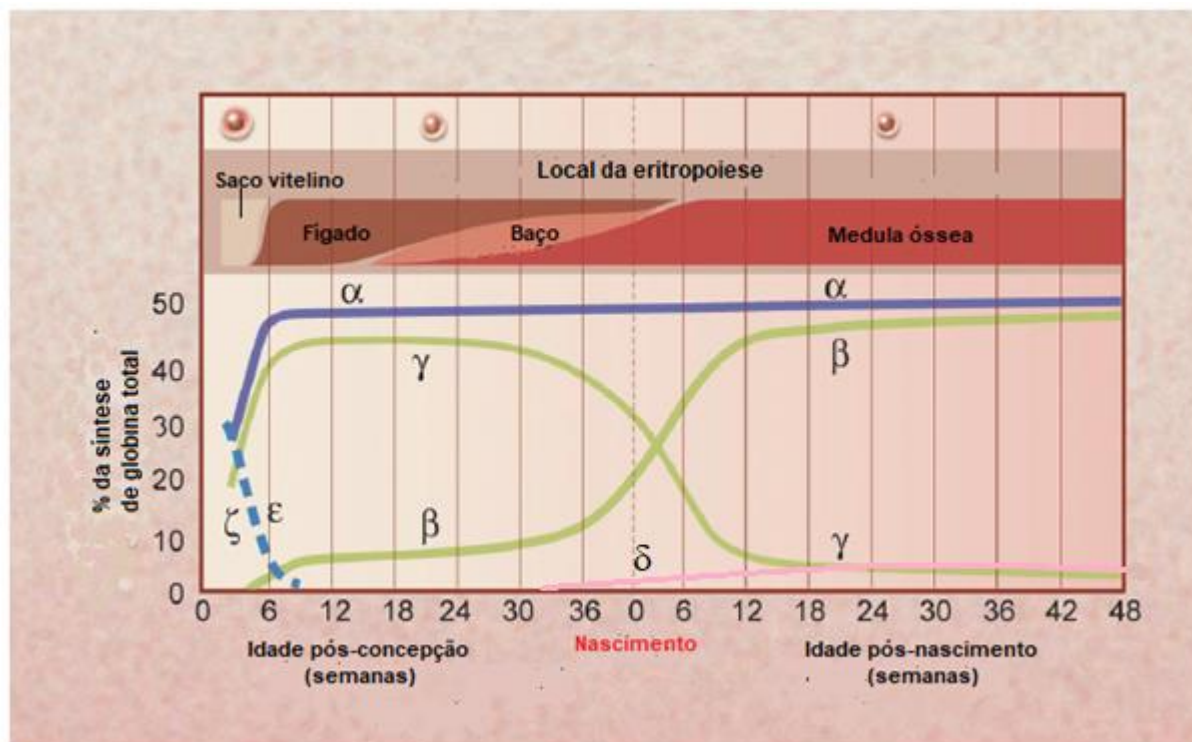
□: não expresso.

Ao longo da ontogênese, diversas alterações fisiológicas são observadas a nível das necessidades de demanda de O_2 , as quais são acompanhadas de alterações na expressão dos genes que codificam as cadeias de globinas. Mudanças progressivas, específicas e sequenciais na expressão dos genes de tais proteínas fazem-se necessárias desde o decurso da vida embrionária até à idade adulta, sendo responsável, desta maneira, pelo surgimento de diferentes tipos de hemoglobinas (PHILIPSEN; HARDISON, 2018; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

No transcurso da síntese das globinas humanas, ocorrem duas comutações ou *switches* essenciais: a passagem da Hb embrionária para a Hb fetal (Hb F), por volta da 6^a semana gestacional, e a substituição da Hb F pela Hb do adulto (Hb A), após o parto (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; SIMONS *et al.*, 2018; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005).

As primeiras células com Hb são produzidas no saco vitelino, durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Posteriormente, inicia-se a eritropoiese hepática, principal fonte de eritrócitos durante o desenvolvimento fetal, e, a seguir, a eritropoiese esplênica e a medular. A medula óssea tem como grande característica a produção persistente de eritrócitos que acompanha toda a vida do indivíduo (FIGURA 6) (CORDOVIL, 2018; GELL, 2018).

Figura 6 – Ontogenia das hemoglobinas



Fonte: Adaptado de Weatherall (2001).

α, ζ: Cadeias α-globina da molécula de hemoglobina; β, γ, ε, δ: Cadeias β-globina da molécula de hemoglobina.

No período embrionário, os primeiros genes a serem expressos nos eritroblastos primitivos, localizados no saco vitelino, correspondem às cadeias ζ (*cluster* gênico α) e às cadeias ε (*cluster* gênico β). As suas sínteses têm início nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, levando à formação da Hb Gower-1 (ζ₂ε₂). Por volta das 6 (seis) semanas iniciais de gestação, os eritroblastos primitivos começam a sintetizar as cadeias α, β e γ. É nesta fase que as demais Hb embrionárias, Gower-2 (α₂ε₂) e Hb Portland (ζ₂γ₂), são detectadas e produzidas, até por volta do final do primeiro trimestre gestacional (FRENETTE; ATWEH, 2007; SIMONS *et al.*, 2018; WIENERT *et al.*, 2018).

Por grande parte da vida intrauterina, verifica-se uma grande produção das globinas α e γ, com predomínio da síntese da Hb F (α₂γ₂). Progressivamente, há um aumento da síntese das cadeias β e, já no final do período de gestação, ocorre uma mudança (*switch*) quando a síntese da cadeia γ é largamente substituída pela síntese de cadeia β, dando origem à produção da Hb A (α₂β₂). O mecanismo pelo qual esta mudança ocorre ainda é desconhecido, parecendo dever-se ao estado de metilação do gene, ou, ainda, ao condicionamento cromossômico ou a outras condições que podem afetar ou influir na transcrição genética (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; HOFFBRAND; STEENSMA, 2019).

A produção de cadeias δ tem seu início por volta da 25ª semana gestacional, em concentrações residuais, permanecendo nestes níveis até o nascimento. Estas cadeias, quando ligadas às cadeias α , dão origem à hemoglobina A₂ (Hb A₂) ($\alpha_2\delta_2$), que, durante os primeiros seis meses após nascimento, sofre discreto aumento de sua concentração, estabilizando-se, assim, por todo o decurso da vida do indivíduo (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; HOFFBRAND; STEENSMA, 2019; SIMONS *et al.*, 2018).

A Hb A constitui, aproximadamente, 98% do conteúdo total de hemoglobina na fase adulta. Apesar da sua predominância, a variante A₂ (Hb A₂) também está presente em pequenas quantidades. A distribuição proporcional das diferentes Hb nos eritrócitos do indivíduo adulto fica assim definida: Hb A = 96-98%, Hb A₂ = 2,5-3% e Hb F = 0%-1% (AKINBAMI *et al.*, 2018; TRAEGER-SYNODINOS *et al.*, 2015).

A Hb F é considerada a Hb de maior concentração durante a vida intrauterina, sendo a variedade de Hb predominante no feto e no recém-nascido (RN), cuja concentração varia de 55-85% da Hb total. No entanto, em condições normais, o declive da Hb F é rápido de tal forma que, aos 6 (seis) meses de vida, só se detecta cerca de 5% desta Hb, e, aos 12 (doze) meses, são detectados valores residuais, semelhantes ao de um indivíduo adulto. Esta Hb possui uma afinidade para o O₂ superior à da Hb A, o que facilita a transferência de O₂ entre a mãe e o feto e, em algumas condições patológicas, auxilia no prognóstico favorável do paciente (BAIN, 2008; SIMONS *et al.*, 2018).

A tabela 1 resume os diferentes fenótipos de hemoglobinas normais e suas respectivas cadeias globínicas constituintes.

Tabela 1 – Hemoglobinas normais no desenvolvimento humano

Período de desenvolvimento	Tipos de hemoglobina	Subunidade do cluster α	Subunidade do cluster β	Cadeias globínicas	Período predominante de síntese
Embrionário	Gower-1	ζ	ϵ	$\zeta_2\epsilon_2$	Embrião/até ao 3º mês gestacional
	Gower-2	α	ϵ	$\alpha_2\epsilon_2$	
	Portland	ζ	γ	$\zeta_2\gamma_2$	
Fetal	Hb F	α	γ	$\alpha_2\gamma_2$	Feto/ e até o 6º mês de vida
Adulto	Hb A	α	β	$\alpha_2\beta_2$	Vida adulta
	Hb A ₂	α	δ	$\alpha_2\delta_2$	Feto/vida adulta

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

2.1.4 Hemoglobinas variantes e as hemoglobinopatias hereditárias

Estima-se que mais de 7.000.000 de crianças nasçam a cada ano com algum tipo de anomalia congênita ou doença genética, em todo o mundo, e que cerca de 90% desses nascimentos ocorram em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Desses nascimentos, aproximadamente, 25% consistem em apenas 05 (cinco) tipos de distúrbios, sendo 02 (dois), dos quais, doenças monogênicas e com envolvimento de severas crises hemolíticas no seu processo de patogênese: os distúrbios hereditários da Hb e a deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) (MODELL; DARLISON, 2008; WEATHERALL, 2010).

Os distúrbios hereditários da hemoglobina lançaram as bases da medicina molecular quando, em 1949, Linus Pauling *et al.* descreveram a AF como sendo a primeira ‘doença molecular’ (PAULING *et al.*, 1949); vindo a sua estrutura molecular a ser descoberta somente alguns anos após, em 1957, por Vernon Ingram (INGRAM, 1957).

As hemoglobinopatias são caracterizadas pela presença de variantes anormais da cadeia globínica, que implicam em alterações estruturais e/ou funcionais na molécula da Hb - hemoglobinas variantes. Sendo herdadas como características autossômicas recessivas, elas representam as doenças monogênicas mais comuns que afetam a população mundial, carregando em sua fisiopatologia um forte impacto na qualidade de vida do indivíduo acometido e considerável mortalidade e morbidade global. No entanto, algumas hemoglobinopatias podem derivar da herança de um gene autossômico dominante que dará origem a episódios hemolíticos, mesmo em estado de heterozigose, ao contrário das patologias associadas aos genes autossômicos recessivos, que necessitam de um estado de homozigose para desenvolver a doença (TURGEON, 2012).

Não obstante ainda serem muito negligenciadas pelos programas de saúde pública em muitos países, acredita-se que cerca de 7% dos seres humanos são portadores de alguma das mutações responsáveis por esses transtornos de Hb (CARIO, 2018; FARASHI; HARTEVELD, 2018; PIEL, 2016).

As hemoglobinas variantes oferecem a lista mais abrangente de mutações humanas em proteínas, já sendo conhecido, até a presente data, mais de 500 variantes genéticas que induzem alterações quantitativas de Hb, e cerca de 1200 variantes estruturais, associadas à alterações qualitativas nas cadeias globínicas (CARIO, 2018; INGRAM, 2004; MANCA; MASALA, 2008; PIEL, 2016). Essas variantes são originadas por anormalidades genéticas que podem afetar as propriedades físicas ou químicas da molécula, resultando em alterações na sua solubilidade, estabilidade ou afinidade pelo O₂ (INGRAM, 2004).

Com base no gene envolvido e tipo de alteração apresentada, as hemoglobinopatias podem ser caracterizadas e classificadas em dois grupos principais:

- Hemoglobinopatias por variantes estruturais: cujas alterações decorrem de mutações pontuais em uma ou mais bases que codificam os aminoácidos. Incluem a substituição, deleção ou inserção de aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes causando a formação de uma Hb anormal.

- Hemoglobinopatias por defeito de síntese das cadeias globínicas (ou síndromes talassêmicas). As alterações de síntese caracterizam-se pela síntese reduzida ou nula de um ou mais tipos de cadeias globínicas (BUNN; FORGET, 1986; FARASHI; HARTEVELD, 2018; STEINBERG; NAGEL, 2001; THEIN, 2018; WIENERT *et al.*, 2018).

Existe ainda uma terceira família que compreende condições nas quais há um defeito na troca normal da Hb F pela adulta que é chamada de persistência hereditária da hemoglobina fetal, ou PHHF. Embora, sem importância clínica *per se*, a co-hereditariedade de algumas formas de PHHF pode modificar os fenótipos associados às variantes estruturais da Hb ou talassaemias (WEATHERALL, 2001).

Dentre todas as hemoglobinopatias hereditárias, destaca-se, não somente por ser a de maior frequência mundial, mas também por apresentar as mais severas manifestações clínicas ao paciente, a *Anemia Falciforme*, cuja base de sua fisiopatologia se deve à presença da hemoglobina S (Hb S ou hemoglobina falciforme, do inglês, '*sickle*' (foice)), uma Hb resultante de uma alteração estrutural por substituição de um aminoácido na sua cadeia globínica normal, que sob determinadas condições, sofre polimerização, induzindo graves consequências ao indivíduo portador (PELIZARO *et al.*, 2012).

2.2 Anemia falciforme

2.2.1 Definição clássica

Segundo Steinberg (2016), anemia falciforme é uma condição de homozigose de Hb S formada pela combinação dos dímeros de α -globina e da cadeia anormal de β^S -globina ($\alpha_2\beta^S_2$), resultante de uma mutação pontual no gene da β -hemoglobina que codifica a cadeia variante β -globina falciforme (β^S).

2.2.2 Perspectiva histórica

A primeira descrição formal sobre a ‘doença com células em forma de foice’ deve-se a um relato de caso de um paciente de 20 anos de idade, de nome Walter Clement Noel. Ele, estudante de odontologia em Chicago-EUA, nos anos de 1904-1907, era de raça negra, oriundo de Granada, nas Índias Ocidentais, e sofria de fortes dores no corpo e anemia severa. Em 1910, o notório médico cardiologista que acompanhava este paciente, Dr. James Herrick, relatou o caso como sendo de uma anemia grave, um pouco diferenciada, com forte característica de “tom amarelado nas escleras”, episódios de rinite crônica e aguda, febre, gânglios aumentados, alterações cardíacas, complicações pulmonares e presença de intrigantes úlceras nos membros inferiores (HERRICK, 1910).

Herrick observou, em microscopia de esfregaços de sangue periférico, que as hemácias (eritrócitos) do paciente se apresentavam de forma peculiarmente finas e alongadas, cunhando pela primeira vez o termo ‘hemácias em forma de foice’ para descrever a morfologia das células que, anos mais tarde, daria o nome à doença. No entanto, devido aos sintomas atípicos que o paciente apresentava, Herrick não tinha certeza se aquela condição que o paciente apresentava tratava-se de uma doença *sui generis* ou de uma manifestação de outra (s) doença (s). Fora pensado ainda que se tratava de uma provável sífilis ou um parasita intestinal, ficando, porém, o diagnóstico em aberto até que novos possíveis casos viessem a reforçar esses achados (HERRICK, 1910).

Na concepção de alguns historiadores, o destaque aos eritrócitos em forma de foice e a decisão de manter o diagnóstico inconcluso têm uma mesma explicação: a posição de James Herrick retratava uma transição na prática da investigação médica. A ascensão da medicina clínica moderna, que aliou as novas técnicas oriundas do laboratório ao tradicional método comparativo, provocou a diversificação das concepções médicas sobre o sangue e seus elementos constitutivos. Portanto, ao passo que elegeu os eritrócitos falciformes como características relevantes para a interpretação do caso de Walter Noel, Herrick utilizava também os conhecimentos adquiridos na prática clínica tradicional, que o faziam ser cauteloso nos diagnósticos que não encontrava correlatos na literatura médica da época (WAILOO, 1991).

Mason cunhou, então, o nome "anemia falciforme" para descrever o distúrbio ‘recém-descoberto’, através da publicação de seu estudo intitulado “*Sickle Cell Anemia*”, em 1922. Todavia, por se tratarem de pacientes oriundos do continente africano, tal observação levou ao equívoco comum de que a doença estava confinada a pessoas de origem africana, sendo, por isso, concebida também como uma doença específica do ‘sangue negro’ (MASON, 1922).

Os primeiros esforços para determinar as bases genéticas das células vermelhas falcizadas foram reportados por Victor Emmel (1917), que sugeriu a hereditariedade depois de

observar falcização em pai e filho (EMMEL, 1917). Em 1923, John Huck, um graduado da Escola de Medicina da Universidade *Johns Hopkins*, e professor de microscopia clínica, realizou os primeiros estudos abrangentes da falcização como um fenômeno hereditário (HUCK, 1923, *apud* TALIAFERRO; HUCK, 2023). À medida que as imagens clínicas e laboratoriais da doença se tornaram mais completas, elas também se tornaram mais complexas (FELDMAN; TAUBER, 1997).

Em 1949, Linus Pauling *et al.* levantaram a hipótese de que a AF poderia ser originada de anormalidades na molécula de Hb, cujas alterações físico-químicas justificariam a denominação: “doença molecular” (PAULING *et al.*, 1949). Concomitantemente, alguns pesquisadores relataram a relevante importância da Hb F no desenvolvimento das manifestações clínicas da doença ao descreverem que os sintomas da AF apareciam em crianças logo após a diminuição dos níveis dessa Hb, sugerindo uma possível relação benéfica entre o aumento dos níveis de Hb F e a sintomatologia apresentada pelos pacientes (WATSON; STAHRMAN; BILELLO, 1948).

Passados cerca de 10 (dez) anos, Ingram (1958) demonstrou que a mutação responsável por originar a Hb S é resultante da alteração de apenas um aminoácido da Hb A. Ele demonstrou que a substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia da β -globina era a base genética da Hb S. Tal achado explicou, dentre outras coisas, a diferença eletroforética entre as duas globinas, e foi a primeira demonstração de uma substituição de aminoácido em proteína humana.

No Brasil dos anos 30, foi publicado, pela primeira vez, um caso dessa referida doença, que surgiu em meio aos vários tipos de anemia que, conforme médicos do período, acometiam grande parcela dos doentes do país. Na visão médica de então, embora se considerasse a anemia como um sintoma clínico, as “anemias” representavam uma classificação de doença, que provocava dificuldades de diagnóstico em função de suas variadas causas. Na década de 1940, o interesse pelo sangue aumentou consideravelmente em função da Segunda Guerra Mundial, o que ocasionou o crescimento da demanda por transfusões sanguíneas (CAVALCANTI, 2007).

As primeiras pesquisas referentes a esta hemoglobinopatia devem-se às investigações feitas pelo médico Álvaro Serra de Castro, em 1933, no Hospital São Francisco de Assis, no Rio de Janeiro, e apresentadas, em 27 de junho do mesmo ano, em sessão da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro (COUTINHO, 1933, *apud* CAVALCANTI, 2007). Em seu relato, Coutinho (1933, *apud* CAVALCANTI, 2007) defendia que, dentre as anemias, a AF deveria estar em destaque nos conhecimentos médicos. Ele foi um grande defensor da quebra

do paradigma de que o ‘sangue do brasileiro era pobre e fraco’, e que todas as anemias eram resultado de outras causas, como parasitoses, influência climática tropical ou subnutrição.

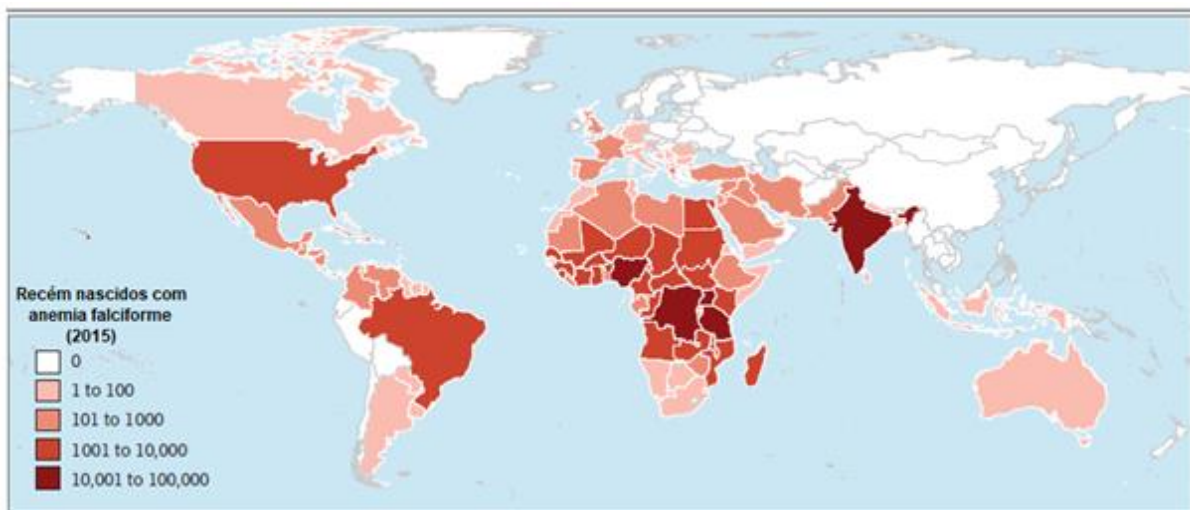
A primeira publicação brasileira específica sobre a doença foi um artigo de autoria de Castro (1934, *apud* CAVALCANTI, 2007): ‘A Anemia de Hematias Falciformes’, publicado no *Jornal de Pediatria*, sendo, a partir daí, considerado, por seus contemporâneos, como o primeiro profissional a identificar um caso da doença no país (ARAÚJO, 1961, *apud* CAVALCANTI, 2007).

Contudo, o avanço da medicina molecular, além de elucidar a base genética da DF, também expôs ao mundo, dominado por uma sociedade extremamente racista e capitalista, que esta, bem como muitas outras doenças vistas, até então, como limitadas a uma condição racial ou social, tratava-se, na verdade, de uma patologia de gênese hereditária, cujo limiar extrapolava raças, credos, distribuição geográfica, etnia e posição social.

2.2.3 Epidemiologia- Origem e dispersão da Hb S

As hemoglobinopatias hereditárias representam o grupo de doenças monogênicas mais comuns em todo o mundo, tendo na AF um de seus principais e mais severos representantes, com distribuição predominante em países da África, América do Sul, América Central, Arábia Saudita, Índia, Turquia, Grécia e Itália (CONRAN; TORRES, 2019; KATO *et al.*, 2018; PIEL, 2016; WEATHERALL; CLEGG, 2001). A figura 7 apresenta a distribuição global de nascidos vivos com AF no ano de 2015.

Figura 7 – Distribuição global de recém-nascidos com anemia falciforme



Fonte: Adaptado de Piel; Steinberg; Rees (2017).

Embora tenha sido extensivamente estudada em nível molecular e celular, os dados epidemiológicos para mensurar e avaliar o fardo e impacto que esta doença gera à saúde e qualidade de vida, como um todo, dos indivíduos acometidos são frequentemente limitados e subnotificados, particularmente, em regiões de alta prevalência, as quais se localizam, primordialmente, em áreas tropicais (PIEL, 2016).

Sabe-se, todavia, que ainda existe uma preocupante ausência de reconhecimento oficial dos distúrbios hereditários da Hb como uma prioridade na saúde pública em escalas nacional, regional e global, sendo percebido tal fato pela inexistência de implementação de programas de prevenção e manejo para tais distúrbios em muitos países, especialmente, nos países mais afetados (PIEL, 2016; STREETLY *et al.*, 2009). Dados de estudos africanos, por exemplo, indicam um índice de mortalidade por DF na infância (antes dos 5 anos de idade) que chega a atingir 90% (GROSSE *et al.*, 2011), e cerca de 25-30% das crianças com a doença vão à óbito no restante do mundo (MONTEIRO; IANO; FRANÇA, 2017).

Estimativas sugerem que o número global de partos de crianças com HbAS, ou seja, heterozigotas para Hb S (ou traço falciforme), e para crianças com HbSS (anemia falciforme) perfazem 5.476.000 (intervalo interquartilico: 5.291.000 - 5.679.000) e 312.000/ano (294.000 - 330.000), respectivamente (PIEL, 2016), com projeções demográficas sinalizando um aumento anual de nascimentos afetados pela AF em 33% entre os anos 2010 – 2050 (PIEL *et al.*, 2013).

Acredita-se que a mutação que produz a Hb S (β^S) está presente em cerca de 24,6% da população mundial (MAKANI *et al.*, 2015; MONTEIRO; IANO; FRANÇA, 2017) e tenha ocorrido há 50-100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico (NAOUM, 2000; WHO, 1982).

Investigações preliminares discordavam quanto ao local de origem da mutação β^S , algumas apontando a Ásia, enquanto outras, a África (GELPI, 1973; LEHMANN; MARANJIAN; MOURANT, 1963; PANTE-DE-SOUSA *et al.*, 1998). No entanto, Wainscoat *et al.* (1983), em um estudo realizado com um grupo de indivíduos jamaicanos com AF, encontraram um grande número de haplótipos distintos, apoiando a hipótese de origem múltipla para a mutação β^S .

Estudos posteriores descreveram que esta mutação, provavelmente, surgiu em pelo menos cinco eventos independentes, dos quais, quatro em populações africanas: em Benin, na República Africana Central (CAR), no Senegal e em Camarões (CHEBLOUNE *et al.*, 1988; LAPOUNIÉROULIE *et al.*, 1992; SERJEANT; VICHINSKY, 2018), e um (01) surgimento independente do alelo mutante também na Ásia (KULOZIK *et al.*, 1986; SERJEANT;

VICHINSKY, 2018). Tais mutações estão associadas à haplótipos, denominados de acordo com sua origem geográfica: Benin (BEN), Bantu (CAR), Senegal (SEN), Camarões e Árabe-Indiano ou Asiático, respectivamente (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018).

Não obstante a incidência da Hb S ser mais prevalente entre os indivíduos da raça negra, os indivíduos de outras etnias, especialmente os que são provenientes do mediterrâneo (Grécia, Itália, etc.), Oriente Médio e Índia, também apresentam a doença (RAMALHO, 1986), e, no Brasil, a intensa miscigenação racial contribui ainda mais para a presença de alelos falciformes na população não negra.

A distribuição geográfica do alelo β^S foi principalmente impulsionada por dois fatores: a endemicidade da malária e os movimentos populacionais (ALLISON, 1954; KATO *et al.*, 2018). A sobreposição entre a distribuição geográfica do alelo β^S e a endemicidade da malária na África Subsaariana levaram, na década de 1950, à concepção da hipótese de que os indivíduos com HbAS poderiam ser protegidos contra a malária por *Plasmodium falciparum* (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; KATO *et al.*, 2018). Essa hipótese, agora comumente chamada de hipótese da malária, foi formulada pela primeira vez por Anthony C. Allison, em 1954, para a DF, devido a uma surpreendente sobreposição geográfica da malária e da anomalia falciforme. A hipótese da malária sugere a conjectura de que o surgimento da mutação β^S é resultante de um processo de proteção seletiva (seleção natural) contra as formas mais letais da malária, e, segundo a qual, a melhora do condicionamento físico dos indivíduos HbAS diante da malária compensa a perda eventual de homozigotos gravemente afetados (ALLISON, 1954).

Dados históricos e biológicos argumentam que a frequência do gene β^S expandiu-se bastante na África há cerca de 3000 anos e, no sul da Ásia, há cerca de 4000 anos, após a introdução de ferramentas de ferro. Isso levou à adoção de um sistema agrícola que promoveu o aumento da densidade de habitações humanas e condições favoráveis de reprodução do mosquito vetor *Anopheles*, transmissor do parasita da malária para o homem (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018).

De igual forma, movimentos populacionais, incluindo o tráfico de escravos, levaram a uma distribuição muito mais ampla do alelo β^S , particularmente na América do Norte e na Europa Ocidental. O mapeamento detalhado da frequência do alelo β^S destacou que as heterogeneidades geográficas na prevalência de distúrbios hereditários da Hb podem ocorrer em curtas distâncias (KATO *et al.*, 2018; PIEL *et al.*, 2013).

A mobilidade dos seres humanos em todo o mundo atingiu um nível sem precedentes. Com as modernas mudanças nos meios e na velocidade do transporte internacional, restrições anteriormente impostas por barreiras naturais e pelas longas distâncias foram bastante

reduzidas. O número de migrantes internacionais aumentou de 92,6 milhões, no ano de 1960, para 165,2 milhões, em 2000, e estimativas sugerem que o número global de migrantes que potencialmente transportam a mutação 'S' aumentou de cerca de 1,6 milhões, em 1960, para 3,6 milhões, em 2000 (PIEL, 2016).

As migrações internacionais podem ter um efeito, a longo prazo, sobre a saúde pública por meio da introdução de genes deletérios em populações, nas quais eles estavam ausentes, anteriormente. A presença da mutação falciforme é um lembrete dos legados do tráfico de escravos do continente africano para as Américas do Norte e do Sul e ilhas do Caribe, e da mais recente imigração dos países mediterrâneos (incluindo, Grécia e Itália) (PANTE-DE-SOUSA *et al.*, 1998; PIEL, 2016). De igual forma, a grande imigração de países do sudeste asiático para a Califórnia e outras partes dos Estados Unidos (EUA), nas últimas décadas, também tem instigado o aumento do número de pacientes afetados por formas graves de talassemias (PIEL, 2016).

Movimentos populacionais também afetam a distribuição de doenças hereditárias da Hb dentro dos mesmos países, onde populações, previamente isoladas, interagem cada vez mais umas com as outras, e um grande número de migrantes movem-se de áreas rurais para áreas urbanas, podendo induzir, dessa maneira, a uma complexidade de genótipos contemporâneos, uma vez que, novas variantes, recentemente introduzidas em uma região, podem interagir com variantes locais e criar fenótipos mais ou menos graves (PIEL, 2016).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Banco Mundial, estima-se que, na África, nasçam cerca de 270 mil crianças por ano com algum tipo de hemoglobinopatia associada à presença da Hb S (BRASIL, 2009). Cerca de 75% dos nascidos com AF, em todo o mundo, são originários da África Subsaariana (KATO *et al.*, 2018; PIEL *et al.*, 2013). Além disso, a África Ocidental tem a maior incidência de doença de HbSC, o segundo tipo mais comum de DF (KATO *et al.*, 2018).

A incidência de Hb S varia por estado, raça e etnia. Entre os afro-americanos, por exemplo, cerca de 01 (um) em 360 RN tem DF, e 01 (um) a cada 600 nascimentos apresenta a AF (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; KATO *et al.*, 2018). O impacto econômico e na saúde da população é imensurável, tanto nos EUA como no restante do mundo, sendo responsável por mais de 113.000 hospitalizações e US \$ 488 milhões em custos anualmente, apenas nos EUA (ANSARI; GAVINS, 2019).

No Brasil, a incidência de DF em RN varia substancialmente entre os estados e regiões, refletindo a heterogeneidade étnica da população brasileira (KATO *et al.*, 2018). Em 2014, essa incidência foi de aproximadamente 01 (um) para 650 RN rastreados no estado da Bahia, 01

(um) em 1.300 nascidos no Rio de Janeiro e de 01 (um) em 13.500, em Santa Catarina (BRASIL, 2014).

Com base nos dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde, anualmente, nascem no Brasil cerca de 3.500 crianças com DF e cerca de 200 mil portadores do traço (BRASIL, 2009, 2014).

Conforme dados atuais da Portaria Conjunta nº 05, de 19 de fevereiro de 2018, do Ministério da Saúde- Brasil, estima-se que há cerca de 60.000 a 100.000 pessoas com AF ou na condição de heterozigotos compostos ou duplos (SC, SE, SD, SBetaTAL– doença falciforme), em todo o país, e que cerca de 4% da população brasileira tenha o traço falciforme (BRASIL, 2018), com prevalência do alelo mutante variando de 1,2% a 10,9%, dependendo da região (KATO *et al.*, 2018).

Os quadros 1 e 2 apresentam a diferença de incidência de Hb S por estado brasileiro.

Quadro 1 – Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme em alguns estados brasileiros

ESTADOS	INCIDÊNCIA
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1.300
Pernambuco, Maranhão, Goiás e Minas Gerais	1:1.400
Espírito Santo	1:1.800
Rio Grande do Sul	1:11.000
Paraná	1:13.500
Santa Catarina	1:13.500

Fonte: Brasil (2014).

Quadro 2 – Incidência de nascidos vivos diagnosticados com traço falciforme em alguns estados brasileiros

ESTADOS	INCIDÊNCIA
Bahia	1:17
Rio de Janeiro	1:20
Pernambuco e Maranhão	1:23
Goiás	1:25
Espírito Santo	1:28
Minas Gerais	1:30
São Paulo	1:40
Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina	1:65

Fonte: Brasil (2014).

No Brasil, 78,6% dos óbitos devido à AF ocorrem até os 29 anos de idade e 37% desse número concentra-se na infância, entre os menores de nove anos (LOUREIRO; ROZENFELD,

2005). As taxas de letalidade infantil e perinatal podem chegar a 80% e entre 20-50%, respectivamente, de crianças não cuidadas, que não conseguem chegar aos 5 anos de vida (CORDOVIL, 2018). Entre os adultos acompanhados nos estados de alta prevalência, como Bahia e Rio de Janeiro, a média da idade de morte por DF ainda é baixa, 26,5 e 31,5 anos, respectivamente (CORDOVIL, 2018; LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

Dito isto, podemos concluir que o número exato de indivíduos afetados pela AF em nível mundial é, atualmente, desconhecido e não pode ser estimado com fidedignidade, devido à escassez de dados epidemiológicos, em particular, dados de mortalidade em áreas de alta prevalência. Sabe-se, contudo, que esta doença encontra-se distribuída na população de forma heterogênea, com maior prevalência nos estados e países que possuem maior concentração de afrodescendentes, com recorte social entre os mais pobres.

2.2.4 Considerações genéticas e moleculares da anemia falciforme

Dentre as hemoglobinopatias, ressaltam-se, em grande notoriedade, as que apresentam a Hb S como Hb variante estrutural, sendo, por essa razão, denominadas de doenças ou síndromes falciformes (STEINBERG, 2008).

Não obstante mais de 15 (quinze) genótipos diferentes tenham sido identificados como causadores de doenças falciformes (REES; GIBSON, 2012), a AF destaca-se por ser a forma mais prevalente e, em geral, a que revela maior gravidade clínica e hematológica (NAOUM, 2000; PELIZARO *et al.*, 2012). No entanto, outros genótipos falciformes ocorrem com a heterozigose composta, quando, por exemplo, o gene β^S interage com outras variantes do gene da β -globina, como o gene da hemoglobina C (Hb C), hemoglobina D (Hb D), ou da β -talassemia, dentre outros, gerando combinações que também são sintomáticas, denominadas, respectivamente, como hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD e S/beta-talassemia (BALLAS, 2018).

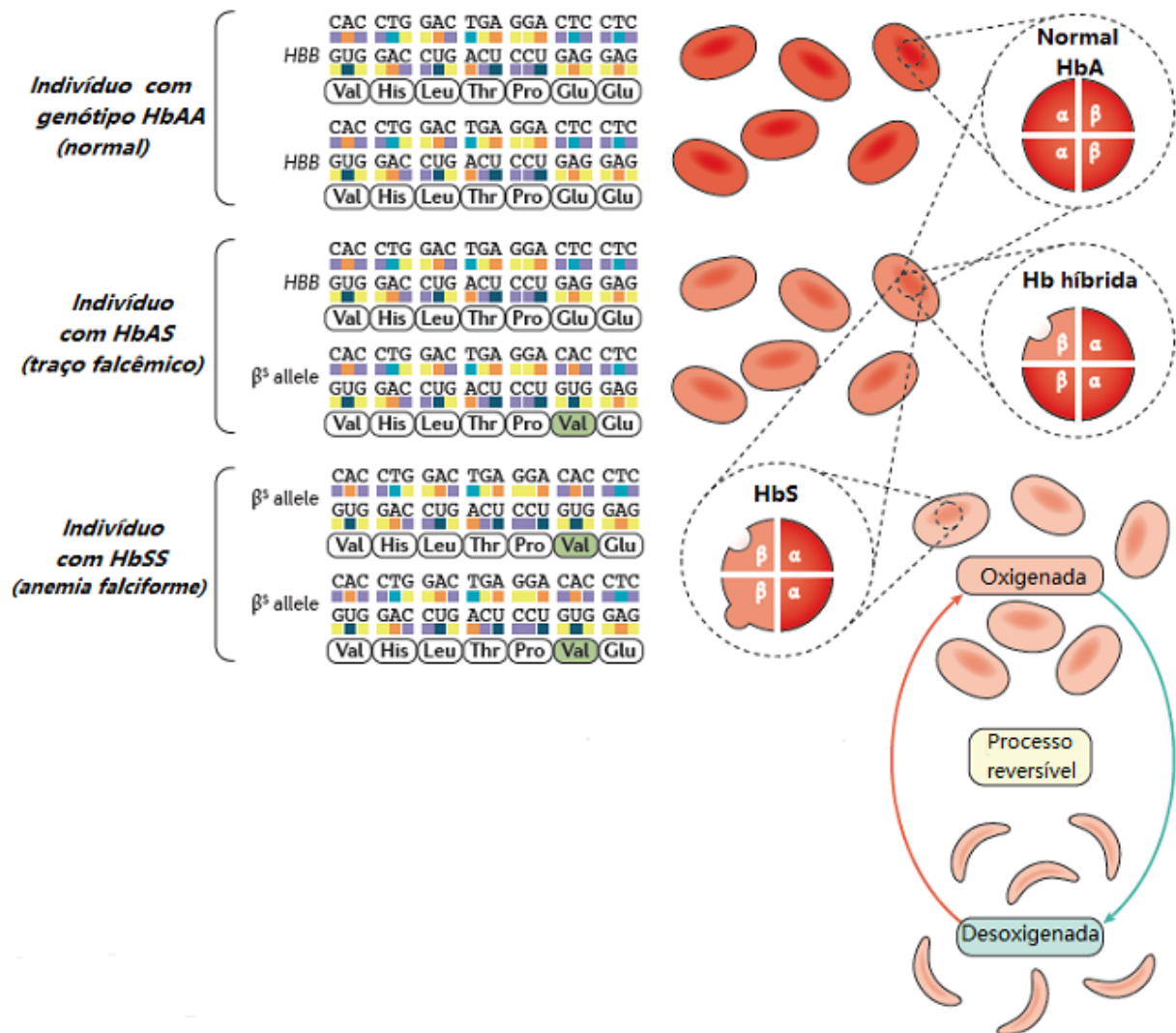
A denominação “anemia falciforme” é reservada para a forma da doença que ocorre em indivíduos homozigotos (HbSS), e trata-se de uma doença hereditária, monogênica, de herança autossômica, codominante para a mobilidade eletroforética (BALLAS, 2018; STEINBERG, 2008). A heterozigose (HbAS) não causa doença, mas é detectável, podendo os portadores do traço falciforme apresentarem de 30 a 40% da Hb variante, ao passo que os indivíduos acometidos de AF exibirem 80% ou mais da Hb S no interior de seus eritrócitos (BALLAS, 2018; NAOUM, 2000).

A maioria dos genitores de crianças com AF são heterozigotos simples, ou seja, apresentam um gene da Hb A associado a um outro da Hb S, transmitindo cada um deles o gene alterado para a criança, que, dessa forma, recebe o gene anormal em dose dupla (SS) – um gene β^S proveniente do pai e outro gene β^S proveniente da mãe. Porém, não é incomum a identificação de um dos pais como afetado pela doença somente durante a investigação familiar suscitada pelo nascimento de um filho diagnosticado através de triagem neonatal ("teste do pezinho") (CORDOVIL, 2018; SCHECHTER, 2008).

A AF é resultante de uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, localizado no braço curto do cromossomo 11, consoante à substituição de uma única base nitrogenada, de uma adenina (A) por uma timina (T), $G\underline{A}G \rightarrow G\underline{T}G$, cuja tradução molecular substitui o aminoácido ácido glutâmico pela valina, acarretando, assim, na formação da Hb mutante “S” no lugar da Hb normal, denominada “A” (CHIRICO; PIALOUX, 2012; EATON; BUNN, 2017; STEINBERG, 2008).

A figura 8 apresenta a representação gráfica da alteração genética responsável pela formação da hemoglobina variante S.

Figura 8 - Alteração genética na cadeia β -globina da molécula de hemoglobina que origina a hemoglobina variante S



Fonte: Adaptado de Kato *et al.* (2018).

A hemoglobina normal A (HbA) é formada por duas subunidades de α -globina e duas subunidades de β -globina, sendo estas últimas codificadas por HBB. O alelo da HbS, β^S , é um alelo HBB no qual uma substituição de adenina por timina resulta na substituição do ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia β -globina madura. Indivíduos com apenas um alelo β^S têm o traço falcêmico (HbAS), mas não a doença. A anemia falciforme ocorre quando ambos os alelos HBB estão mutados, apresentando dois alelos β^S (β^S/β^S). A deoxi-HbS pode sofrer polimerização e os polímeros de HbS podem alterar a estrutura e função do eritrócito, de forma reversível ou não.

Estudos de associações genéticas e genômicas constataram, consistentemente, que a AF é de caracterização multigênica, na qual, o genótipo falciforme, haplótipos da β -globina e outros genes não ligados ao *locus* β -globina, podem participar de eventos patológicos relevantes que induzem à modificação da expressão fenotípica do gene β^S e de manifestações clínicas da doença (JASTANIAH, 2011; KATO *et al.*, 2018). Altos níveis de Hb F (codificadas por HBG1 e HBG2), por exemplo, ou a co-herança de α -talassemia (causada por mutações no HBA1 e

HBA2) estão associados, normalmente, com fenótipos mais leves da doença. No entanto, esses dois biomarcadores explicam apenas uma pequena fração da variabilidade fenotípica observada e possível (JASTANIAH, 2011; STEINBERG, 2016).

Fatores ambientais, como o ambiente doméstico, infecções, condição socioeconômica, nutrição e acesso aos cuidados, também podem influenciar o curso e gravidade da doença e a taxa de sobrevivência (JASTANIAH, 2011; TEWARI *et al.*, 2015). Todavia, estudos mais direcionados e focados na influência e interferência de outros elementos moleculares e ambientais ainda não são tão frequentes (JASTANIAH, 2011).

Microarranjos de expressão estão sendo usados para identificar genes em vários órgãos afetados pela doença em homens e camundongos transgênicos (STUART; NAGEL, 2004). Após esses genes serem localizados, polimorfismos podem ser pesquisados em busca de se identificar modificadores genéticos que ajudarão a definir o risco individual, permitindo intervenções racionais, baseadas na particularidade do indivíduo, antes do início de danos em órgãos ou sistêmico (JASTANIAH, 2011; STUART; NAGEL, 2004).

Pelo exposto, conclui-se que, cada paciente com AF tem uma composição genética *sui generis* e está envolto por um ambiente único que interagem de diferentes maneiras para modificar a gravidade e curso da doença, e, assim, tornar o desenvolvimento das manifestações clínicas e o manejo terapêutico do paciente extremamente variáveis e incógnitos.

2.2.5 Mecanismo fisiopatológico da doença

Um amplo espectro de estímulos anormais e constantes instigam, correntemente, as células sanguíneas e vasculares, do indivíduo com AF, e se propagam por todo o organismo em uma complexidade de sintomas e manifestações diversas (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Notavelmente, essa complexidade clínica deriva de apenas dois eventos próximos, a vaso-oclusão e a hemólise. Embora não seja possível identificar as contribuições proporcionais e a importância das inconveniências resultantes de cada evento, dois temas emergem: primeiro, a vaso-oclusão e a hemólise estão inter-relacionadas e são mutuamente promissoras e interligadas à condição de saturação e disponibilidade de O₂ sanguíneo, ou seja, ao grau de hipóxia. Em segundo lugar, há uma explicação unificadora para o surgimento dessa pluralidade de características clínicas e abundantes mediadores biológicos na AF e tem início na dessaturação e polimerização da Hb S (CABOOT; ALLEN, 2014; HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018).

Durante os anos sessenta e setenta, foi elaborado o primeiro esquema fisiopatológico coerente baseado na polimerização anormal da deoxi-Hb S (Hb S desoxigenada). Isso explica os mecanismos básicos dos eventos vaso-oclusivos, cuja característica marcante e primeira da doença é a clássica crise dolorosa vaso-oclusiva (CVO) (ODIÈVRE *et al.*, 2011).

Segundo Cordovil (2018), três níveis direcionam o conhecimento científico relacionado às alterações fisiopatológicas presentes na AF: nível molecular e celular, o tecidual e o orgânico. No nível molecular, a troca de aminoácidos com diferentes pontos isoelétricos, ácido glutâmico (IP = 2,77) por valina (IP = 5,97), provoca um desequilíbrio devido à perda de cargas negativas da Hb S em relação à Hb A, suficiente para induzir alterações na forma e nas propriedades físicas dos eritrócitos, e, por conseguinte, na sua flexibilidade e funcionalidade (KATO *et al.*, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Embora esta mudança se configure bioquímica e geneticamente como pontual, numa região da molécula de Hb que não a compromete estruturalmente, ela passa a ser crucial quando a molécula de Hb S, em circunstâncias de hipoxemia ou hipóxia, sofre desoxigenação e permite uma aproximação anormal entre moléculas de Hb adjacentes (CHIRICO; PIALOUX, 2012; MANFREDINI *et al.*, 2013; PELIZARO *et al.*, 2012).

Na molécula de Hb normal, o ácido glutâmico (carga elétrica negativa), da posição seis da β -globina, auxilia no afastamento entre as moléculas de Hb desoxigenadas – deoxi-Hb A (MANFREDINI *et al.*, 2013). Em contrapartida, em certos locais ou situações em que a hipóxia ocorre, a ‘valina mutante’, da sexta posição da cadeia β da Hb S, que é hidrofóbica e está na superfície da Hb, começa a formar pontes de hidrogênio com receptores de fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) da molécula adjacente de Hb S (CORDOVIL, 2018; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). Essa condição, por sua vez, induz aproximações intermoleculares e ligações entre os aminoácidos das Hb, favorecendo a formação de agregados insolúveis e tubulares, os polímeros de Hb S, cujas estruturas modificam a arquitetura e plasticidade dos eritrócitos (KATO *et al.*, 2018; MANFREDINI *et al.*, 2013; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

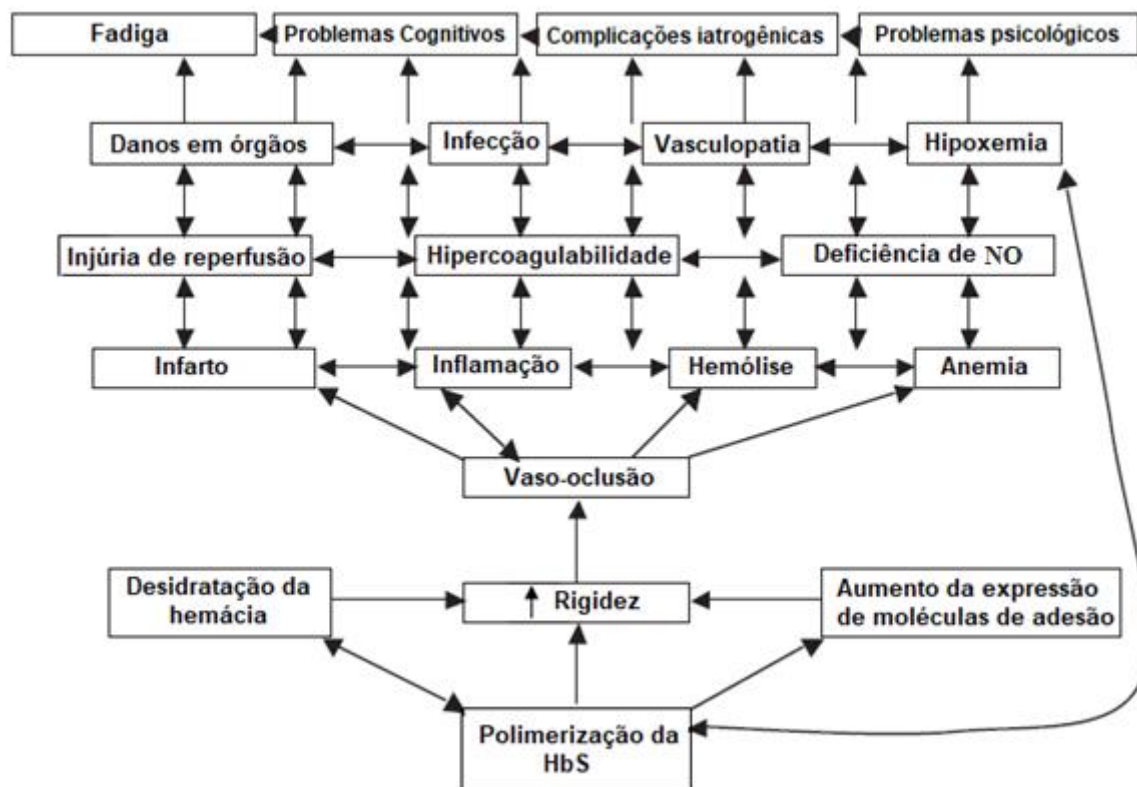
A polimerização da deoxi-Hb S é o evento fundamental e liminar da fisiopatologia da AF (PELIZARO *et al.*, 2012; STEINBERG, 2008). Em decorrência da mesma se apresentar como um gel altamente viscoso e semi-sólido, a Hb S polimerizada comporta-se termodinamicamente similar a um cristal em equilíbrio (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018), sendo responsável pela formação do eritrócito falciforme patognomônico, conferindo a este uma estrutura alongada, rígida e de membrana frágil, com demasiada alteração em sua

estabilidade, solubilidade, deformabilidade e expressão de moléculas de adesão (CHIRICO; PIALOUX, 2012; PICCIN *et al.*, 2019; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

A dificuldade de circulação da célula falcizada na microvasculatura, bem como sua interação com células endoteliais, leucócitos e plaquetas, além de promover o encurtamento da vida média dessas células na circulação e liberação de heme livre, permeia o início do processo de oclusão dos vasos sanguíneos, gerando mais hipóxia tecidual circunjacente e injúrias e danos a diversos órgãos (PIEL; STEINBERG; REES, 2017; REES; GIBSON, 2012).

Repetidas polimerizações da Hb S podem causar danos definitivos na estrutura dos eritrócitos, promovendo eventos hemolíticos e inflamatórios crônicos, com fortes episódios dolorosos de CVO, e uma cascata cíclica de reações (FIGURA 9) que culminam em geração de ERO, estresse oxidativo, lesão e disfunção endotelial, dentre outros (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). A combinação dessas ações está associada com distintas respostas à hipóxia e condições inflamatórias em vários órgãos e sistemas, e pode produzir inúmeros outros estados patológicos secundários (CHIRICO; PIALOUX, 2012; PICCIN *et al.*, 2019; RESS; GIBSON, 2012).

Figura 9 - Diagrama ilustrando a cascata de eventos fisiopatológicos derivados da polimerização da deoxi-Hb S



Fonte: Adaptado de Rees e Gibson (2012).

O fenômeno de polimerização da Hb S também pode ocorrer em reticulócitos, que representam cerca de 20% das células vermelhas do sangue em indivíduos com AF (KATO *et al.*, 2018), e pode ser influenciado por fatores e moduladores diversos, tais como, a tensão de O₂ (pO₂), concentração intracelular da Hb S e Hb F, temperatura, pressão e pH sanguíneos, associação com outras Hb e talassemia, força iônica, grau de desidratação celular (pelo aumento da viscosidade citoplasmática e vazamento de íons K⁺ e água através da membrana), bem como, tempo de circulação dos eritrócitos na microcirculação e por tensões mecânicas (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; PICCIN *et al.*, 2019; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Após esta explanação, podemos inferir que a AF é uma doença hematológica de múltiplos órgãos, cuja base de fisiopatologia é a polimerização de sua Hb variante, resultante de uma simples troca de aminoácidos em sua cadeia constituinte, que, em razão de condições de hipóxia, é capaz de desempenhar um papel preponderante e determinante no desenvolvimento de alterações moleculares, porém, com danos localizados e orgânicos imensuráveis.

2.2.6 Variabilidade clínica

A AF é uma condição multifacetada, de complicações agudas e crônicas, e, apesar de ser resultante de uma mutação genética única, há considerável diversidade no curso e progressão da doença (KATO *et al.*, 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017), dependente de fatores tanto individuais quanto ambientais como possíveis moduladores do desenvolvimento sintomático da doença (IAROVAIA *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2011).

Evidências sugerem, por exemplo, que a presença dos haplótipos da mutação β^S em pacientes com AF está relacionada à gravidade e à evolução da doença, sugerindo melhores prognósticos para os haplótipos Senegal e Asiático, cuja expressão fenotípica de Hb F mostra-se elevada, e pior evolução clínica para os portadores dos haplótipos Bantu e Benin (NAOUM, 2000; SCHNOG *et al.*, 2004).

Comumente, as duas primeiras décadas de vida do paciente são caracterizadas por períodos assintomáticos intercalados com períodos de intensa dor, envolvendo episódios algícos em diversas partes do corpo, particularmente na região peitoral, parte inferior das costas e extremidades (BRANDOW; ZAPPIA; STUCKY, 2017; CORDOVIL, 2018; KATO *et al.*, 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). As manifestações iniciam a partir do momento em que o nível de Hb F reduz-se a níveis inferiores a 30%, com predomínio de Hb S no sangue,

ocorrendo, geralmente, por volta do sexto mês de vida (BANDEIRA *et al.*, 2004; KATO *et al.*, 2018; POWARS *et al.*, 1981; ZIVOT *et al.*, 2018).

A característica marcante da AF, a falcização ou afoiçamento dos eritrócitos, além de causar anemia hemolítica crônica, ainda é responsável pela obstrução de vasos sanguíneos e CVO, que, tipicamente causam inumeráveis distúrbios e eventos agudos, incluindo episódios dolorosos recorrentes, dano isquêmico aos tecidos e infarto e necrose de diversos órgãos, tais como, ossos, articulações, baço, pulmões e rins, dentre outros (ANSARI; GAVINS, 2019; PIEL; STEINBERG; REES, 2017; TURGEON, 2012; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004). A STA é um exemplo típico de falência de órgãos na AF e uma das principais causas de internações e morte entre os pacientes (CORDOVIL, 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

A degeneração progressiva dos órgãos resulta de infartos nas áreas afetadas, levando a várias complicações secundárias que comprometem diretamente a vida e a sobrevivência dos pacientes (ANSARI; GAVINS, 2019; CORDOVIL, 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Indivíduos com AF são mais propensos a ter eventos de AVC, resultando em sérios comprometimentos motores e cognitivos (BRANDOW; ZAPPIA; STUCKY, 2017), hipertensão pulmonar, proteinúria e doença renal crônica. Todas essas complicações estão associadas à disfunção vascular causada pela doença (BALLAS, 2018; CARIO, 2018).

A vasodilatação é bastante reduzida nesses pacientes e pode induzir outras consequências, como o aparecimento de edemas e úlceras, principalmente nas pernas. Essas lesões de úlceras de membros inferiores representam 8 a 10% dos casos e apresentam maior incidência em pessoas do sexo masculino e na faixa etária entre 10 e 50 anos de idade (CONNOR *et al.*, 2017; CORDOVIL, 2018).

As ulcerações podem aparecer após traumas, picadas de insetos, ressecamento excessivo da pele ou de forma espontânea, geralmente, no tornozelo ou região maleolar (porção média ou lateral), onde há menos tecido subcutâneo e fluxo sanguíneo, como consequência da hipóxia tecidual, disfunção endotelial e vaso-oclusão (CONNOR *et al.*, 2017; CORDOVIL, 2018).

Com o passar da idade, o sistema musculoesquelético torna-se cada vez mais alvo de comprometimento (crises dolorosas agudas, dactilite, alterações osteoarticulares e necrose avascular); os sistemas pulmonar e cardiovascular tornam-se sobrecarregados (STA, embolias pulmonares, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca secundária à hemossiderose) (BALLAS, 2018; CONNOR *et al.*, 2017; CORDOVIL, 2018) e o sistema neurológico (eventos cerebrovasculares agudos) e hepático (cálculos biliares, sequestro hepático, siderose hepática e hepatite) também podem ser afetados drasticamente (BALLAS, 2018; CARIO, 2018; MONTEIRO; IANO; FRANÇA, 2017). Crises de sequestro esplênico e hipospinismo, assim

como insuficiência renal crônica e crises aplásticas secundárias também têm efeitos significativos sobre o número de hospitalizações, morbidade e a mortalidade (ANSARI; GAVINS, 2019; SANTOS *et al.*, 2011; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

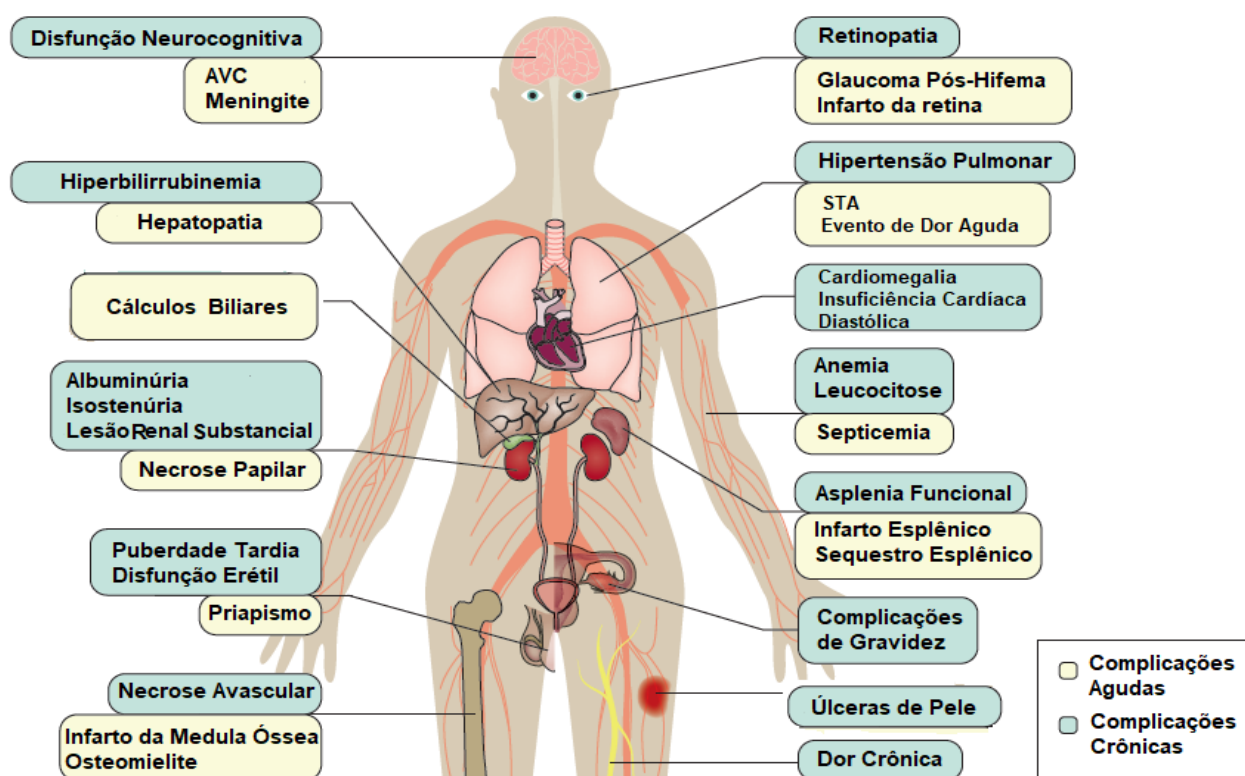
As infecções nos pacientes com AF também são uma das principais causas de preocupação tanto na infância quanto na vida adulta (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Correntemente, esses pacientes apresentam uma defesa imunológica deficiente e uma elevada suscetibilidade às infecções bacterianas, principalmente pneumococos e *Haemophilus influenzae* (NAOUM, 2000; SANTOS, 2010; TURGEON, 2012), bem como ao desenvolvimento de sepse sistêmica avassaladora, devido à disfunção esplênica (BALLAS, 2018; CARIO, 2018). Estas complicações trazem muitos infortúnios e comprometem substancialmente a qualidade de vida e sociabilidade desses pacientes (CARIO, 2018).

O hipermetabolismo presente nesses pacientes tem forte impacto na composição corporal e tem sido relacionado ao aumento do gasto energético, aumento do *turnover* protéico, aumento do estresse oxidativo, do número de reticulócitos e redução da massa corporal (BOREL *et al.*, 1998; CORDOVIL, 2018).

Outras intercorrências de relevância clínica que podem ser manifestas na AF dizem respeito ao hipodesenvolvimento somático, retardo da maturação sexual, eventos de priapismo, pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, parto prematuro, morte perinatal, retinopatias proliferativas ou perda da visão (BRANDOW; ZAPPIA; STUCKY, 2017; CARIO, 2018; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

A figura 10 resume as principais complicações clínicas, agudas e crônicas, da AF, responsáveis pelo encaminhamento do paciente à emergência médica e hospitalizações. Dentre as manifestações agudas, as crises álgicas vaso-oclusivas são as mais comuns e insalubres, enquanto as complicações crônicas são causantes de disfunções orgânicas multímodas, as quais podem contribuir prontamente para a incapacitação física do paciente ou morte precoce do mesmo (KATO *et al.*, 2018).

Figura 10 – Complicações clínicas da anemia falciforme responsáveis pelas principais hospitalizações do paciente



Fonte: Adaptado de Kato *et al.* (2018).

Legenda: AVC, acidente vascular cerebral; STA, síndrome torácica aguda.

Além da multiplicidade sintomática descrita, as complicações iatrogênicas e psicológicas também contribuem significativamente para a morbidade da doença (ANIE, 2005) e, embora o ambiente de hipóxia, a polimerização da Hb S e a vaso-oclusão sejam aceitas como centrais para a patologia, a importância e correta elucidação dos inúmeros outros processos e mediadores biológicos (genéticos ou não) inter-relacionados é mais difícil de se estabelecer. Contudo, faz-se mister o estudo a tal respeito, uma vez que podem influenciar, direta ou indiretamente, a evolução da doença e até provocar gravidades clínicas singulares e inusuais, prejudicando o desenvolvimento e a expectativa de vida do paciente ou, até mesmo, levar o indivíduo ao óbito (ANIE, 2005; NAIK; HAYWOOD, 2015).

2.3 Hipóxia e mecanismos de gravidade na anemia falciforme

Hipóxia e polimerização da Hb S são os dois gatilhos iniciais, unanimemente aceitos, responsáveis pela falcização dos eritrócitos na microvasculatura. Uma vez falcizados, esses eritrócitos, por meio de alterações em suas propriedades biofísicas e reológicas, propiciam a

occlusão de vasos sanguíneos e comprometem o fornecimento de sangue e O₂ aos tecidos e órgãos circunvizinhos (LI *et al.*, 2017; SETTY *et al.*, 2003), induzindo o aparecimento de isquemia, infarto de órgãos e hemólise extra e intravascular (KIM *et al.*, 2017; MACHOGU; MACHADO, 2018).

A isquemia tecidual produzida pela díade hipóxia/polimerização de Hb S irá induzir, por sua vez, mais hipóxia aguda que implicará na continuidade de um ciclo malicioso e contínuo de hipoxia-falcização de eritrócitos, com conseqüentes complicações já conhecidas: crises dolorosas vaso-oclusivas, interações endoteliais-eritrocitárias anormais, STA, hemólise, AVC e lesões de órgãos. Tais eventos são responsáveis por altas morbidade e mortalidade associadas à AF (CABOOT; ALLEN, 2014; CHINAWA *et al.*, 2013; PAPAGEORGIU *et al.*, 2018), assim como pela intitulação da AF como sendo “*uma doença da hipóxia*” (SUN; XIA, 2013, nosso grifo).

Ainda que os termos hipóxia e hipoxemia sejam frequentemente usados de forma intercambiável, eles não são sinônimos (MACHOGU; MACHADO, 2018). A hipoxemia é definida como uma condição na qual a tensão (pressão) arterial de oxigênio (PaO₂) está abaixo do normal, diz respeito à baixa concentração de O₂ no sangue arterial, enquanto hipóxia é definida como presença de baixas quantidades de O₂ ao nível tecidual, ou seja, é concernente à baixa disponibilidade ou insuficiência do suprimento de O₂ para determinados tecidos ou órgãos (CABOOT; ALLEN, 2014; MACHOGU; MACHADO, 2018; SUN; XIA, 2013).

A etiologia da hipóxia na AF é um processo complexo, multifatorial e intermitente (MACHOGU; MACHADO, 2018). Embora ainda não totalmente compreendida, pode ser decorrente tanto da condição de hipoxemia persistente, característica comum dos pacientes tanto em estado estacionário da doença como em crise falcêmica (CABOOT; ALLEN, 2014; CHINAWA *et al.*, 2013), como em virtude da anemia crônica contínua, da baixa afinidade do O₂ pela Hb, da diminuição da capacidade de transporte de O₂ no sangue, do aumento da demanda pelo O₂, do débito cardíaco corrente e da alteração na dinâmica de distribuição do fluxo sanguíneo pelos tecidos e órgãos (HALPHEN *et al.*, 2014; MACHOGU; MACHADO, 2018). O pH, temperatura do ambiente, dióxido de carbono e o difosfoglicerato (2,3-DPG) também podem afetar a curva de dissociação de O₂ e, portanto, a entrega de O₂ aos tecidos (MACHOGU; MACHADO, 2018).

Na AF, a hipóxia tem sido reconhecida como um marcador e preditor de gravidade, estando associada às crises álgicas e vaso-oclusivas, baixa concentração de Hb F, hemólise (HALPHEN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017), STA, AVC, tromboembolismo arterial, priapismo, aumento da ativação e adesão celular (L-selectina, P-selectina, VCAM-1 (molécula de adesão

celular vascular), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e leucotrieno B4), hipertensão pulmonar e disfunção pulmonar progressiva (CABOOT; ALLEN, 2014; KIM *et al.*, 2017; SETTY *et al.*, 2003; SUN; XIA, 2013).

Lesões endoteliais adicionais podem resultar da isquemia-reperusão, após a restauração do fluxo sanguíneo e reoxigenação dos eritrócitos e endotélio, com danos exacerbados pela produção de ERO e de mediadores pró-inflamatórios, aumento da emigração celular através do endotélio, conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, ativação do fator nuclear-kappa- β (NF-k β) e aumento da sensibilidade à dor, conferindo à AF a condição de estado inflamatório crônico e constante (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011; HALPHEN *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016).

Vale ressaltar ainda que, após a hipóxia, o período de reoxigenação ativa mecanismos de estresse de reperusão, os quais induzem o surgimento de danos oxidativos, inflamação, estase em microvasos dorsais e adesão vascular, coagulação, ativação endotelial, modulação anormal do tônus vascular e anormalidades hemorreológicas. Sendo assim, o estresse Hipóxia/Reoxigenação ativa os principais fatores envolvidos na CVO da DF (ABDALLAH, NASSAR; ABD-EL-SALAM, 2011; AUFRADET *et al.*, 2013; NEMETH; FURKA; MIKO, 2014; TAN *et al.*, 2016).

Ademais, a hemólise gerada por influência da hipóxia também induz uma diminuição da biodisponibilidade de NO, a liberação de adenosina (que irá induzir a produção de 2,3-DPG e falcização), liberação do grupo heme, sobrecarga de ferro e ferritina (KIM *et al.*, 2017), bem como o aumento da disfunção e dano endotelial, vasculopatia, ativação da coagulação, inflamação e mais hipóxia (CHINAWA *et al.*, 2013).

As consequências da hipóxia, em longo prazo, ainda não são claras (HALPHEN *et al.*, 2014). No entanto, sabe-se que a extensão da polimerização da Hb S e da gravidade da AF é proporcional ao grau e duração da desoxigenação da Hb, que faz com que o estresse hipóxico crônico resulte em uma remodelação irreversível da vasculatura e desenvolvimento de inúmeros outros processos fisiológicos e patológicos, como a angiogênese e inflamação, por exemplo (KIM *et al.*, 2017; MACHOGU; MACHADO, 2018). Tais transformações devem-se, sobretudo, a fatores de transcrição induzíveis por hipóxia, os quais regulam a expressão de uma variedade de outros genes e, dessa forma, são capazes de induzir um vasto maquinário de expressão e atividade de proteínas celulares fisiológicas e vitais ao indivíduo (KIM *et al.*, 2017; MACHOGU; MACHADO, 2018; TAN *et al.*, 2016).

Outrossim, a hipóxia é capaz de induzir ainda uma resposta celular projetada para aumentar a quantidade de O₂ fornecida ao tecido, enquanto altera outros processos celulares,

como a produção de trifosfato de adenosina (ATP) pela glicólise anaeróbica, a proliferação celular, metabolismo da glicose e morfologia celular, dentre outros; estando associada diretamente a danos na molécula de DNA e ao desenvolvimento tumoral e cancerígeno em numerosas neoplasias (KIM *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2016).

2.3.1 O Sistema HIF

A hipóxia, ou diminuição da concentração/disponibilidade de O₂, tem consequências profundas para os tecidos de um organismo aeróbico e resulta na ativação de várias respostas e mecanismos diferentes, tanto ao nível celular quanto ao nível de organismo como um todo (ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014). Essas respostas incluem mudanças drásticas na expressão gênica e produção de proteínas celulares que permitem ao organismo (ou célula) gerenciar, eficientemente, o estresse hipóxico e promover a preservação celular (ou de um órgão ou tecido) e a conservação de energia para as suas atividades metabólicas essenciais (MASOUD; LI, 2015; ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

Tais alterações são empreendidas com o intuito de restaurar a oxigenação ou propiciar a adaptação do organismo ao ambiente de hipóxia, sendo mediadas, principalmente, por uma família de fatores de transcrição lábeis ao O₂, os fatores induzíveis por hipóxia (HIF, do inglês, *hypoxia-inducible factor*). Os HIF controlam uma variedade de processos fisiológicos, desempenhando um papel crítico na homeostase do O₂ (KAELIN; RATCLIFFE, 2008; MASOUD; LI, 2015), tendo como seu principal membro, o gene *HIF-1 α* (MASOUD; LI, 2015; ZHANG *et al.*, 2014).

Os HIF são uma família de fatores de transcrição heterodiméricos, cujas proteínas ativas são constituídas por duas subunidades: uma subunidade α e outra subunidade β . Três subunidades α , denominadas HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α , já foram descritas em humanos, e todas se ligam a uma subunidade β comum, denominada, alternativamente, HIF-1 β , ou translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto de arila (ARNT, do inglês, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) (KE; COSTA, 2006; MASOUD; LI, 2015; NATH; SZABO, 2012). O HIF-1 α é ubiquamente expresso em todo o organismo, enquanto a expressão do HIF-2 α é mais restrita para certos tecidos específicos, e ainda pouco se sabe sobre o HIF-3 α (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011; NATH; SZABO, 2012; ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

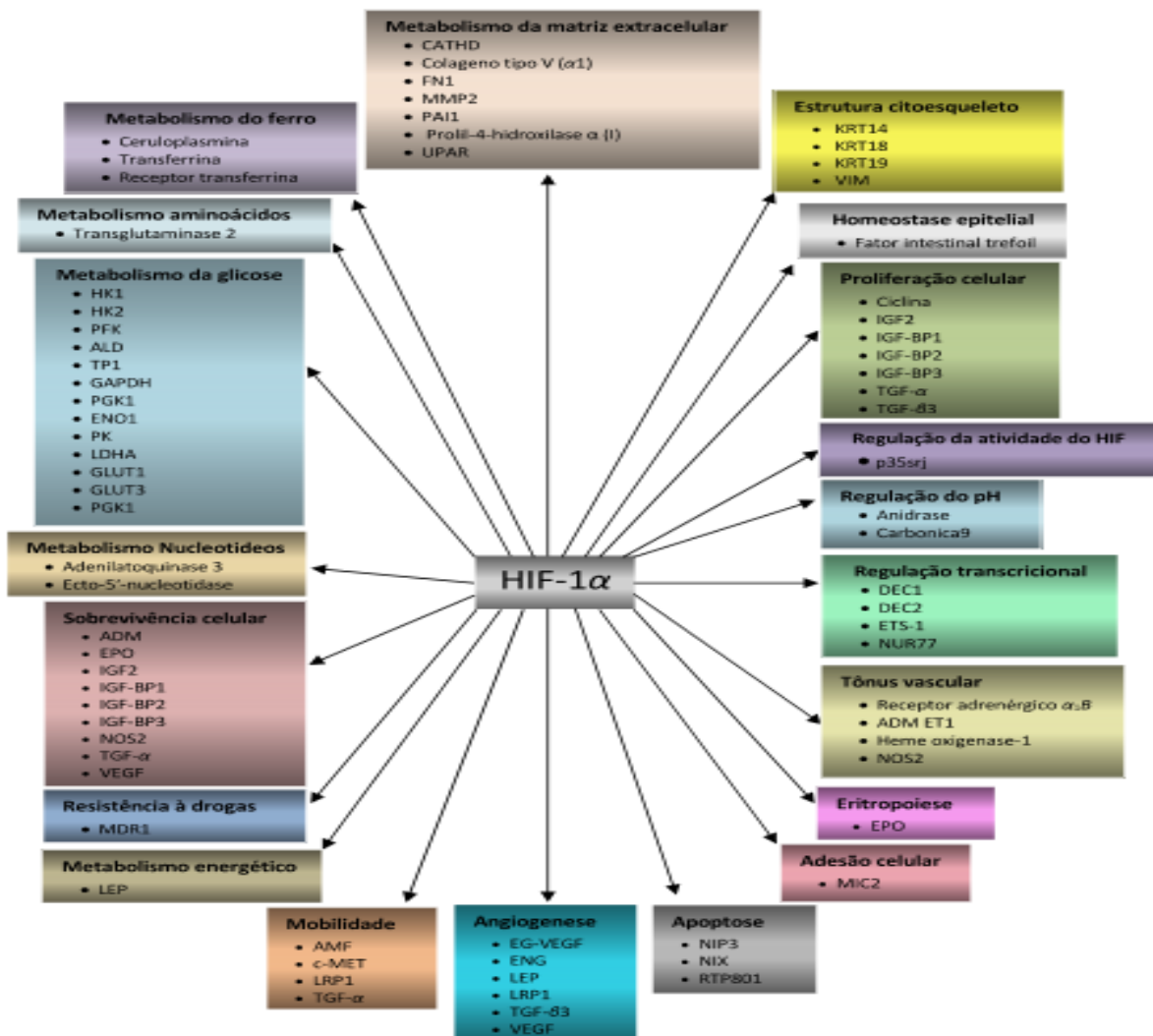
O HIF-1 α é uma subunidade sensível ao O₂, cuja expressão é induzida sob condições de baixa oxigenação, sendo considerado o principal regulador da resposta transcricional homeostática à hipóxia em todas as células e tecidos. Ele intervém, com excelência, no

metabolismo, estresse e na adaptação dos tecidos à diminuição da disponibilidade de O₂. Em contraste, o HIF-1 β é constitutivamente expresso e não significativamente afetado pelo O₂ (ELTZSCHIG; BRATTON; COLGAN, 2014; ZIELLO; JOVIN; HUANG, 2007).

Ambas as subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β , pertencem a família de proteínas hélice-alça-hélice básica, com domínio PAS (bHLH-PAS, do inglês, *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*) e juntas ativam a transcrição de numerosos genes envolvidos tanto na sobrevivência como na proliferação celular (LIM *et al.*, 2013; SEMENZA, 2009). Dentre os genes alvos que sofrem mediação do *HIF-1 α* , destacam-se os implicados em processos inflamatórios, em neovascularização, eritropoiese, apoptose, autofagia, homeostasia epitelial, tônus vascular, metabolismo do ferro e formação do citoesqueleto (HAMMOND *et al.*, 2014; NATH; SZABO, 2012; ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

A figura 11 apresenta os principais genes alvos transcritos pelo gene *HIF-1 α* .

Figura 11 – Genes ativados transcricionalmente pelo *HIF-1 α*



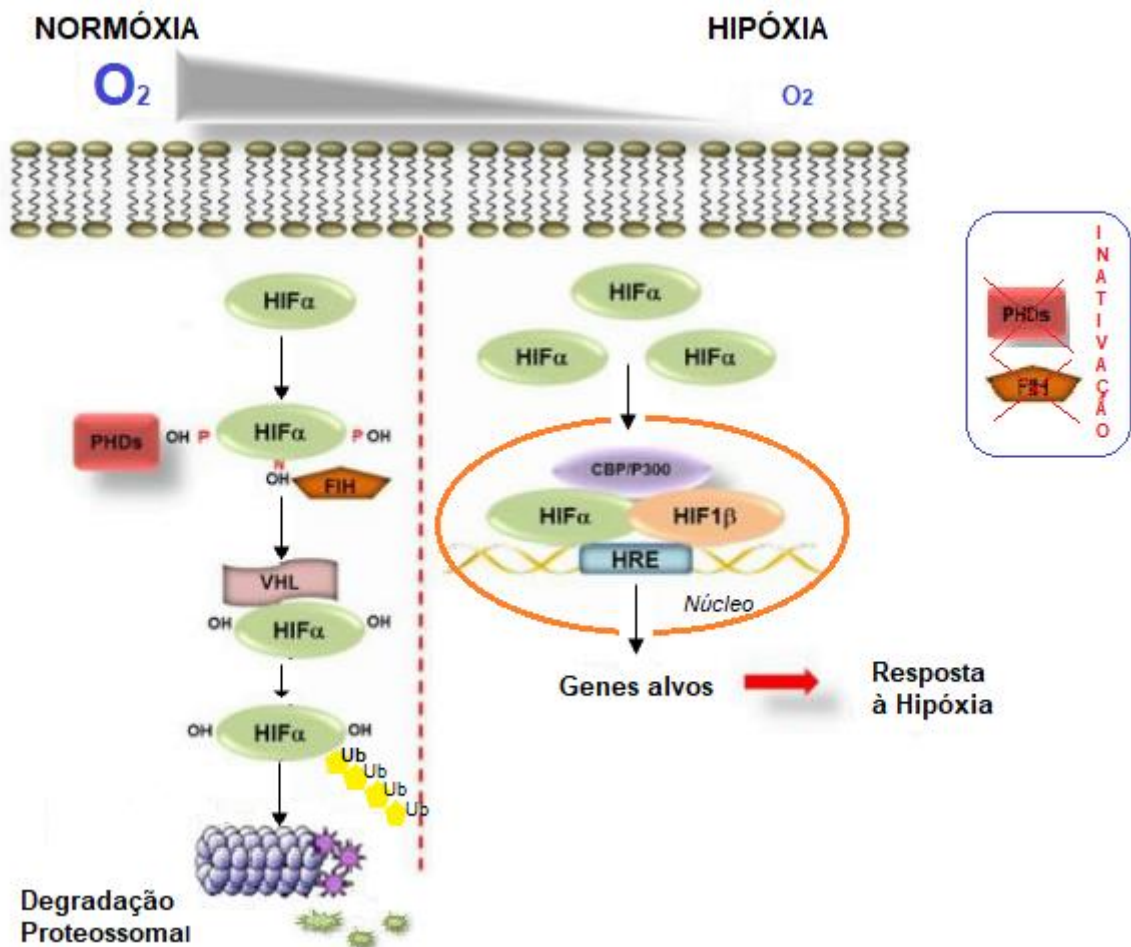
Fonte: Adaptado de Semenza (2003).

Em condições de normóxia, e na ausência de outras perturbações metabólicas, o HIF-1 α é sintetizado e degradado constantemente através do sistema de ubiquitinação-proteossomal 26S (KAELIN; RATCLIFFE, 2008; SEMENZA, 2014). Logo após a síntese da proteína HIF-1 α , o processo de degradação é iniciado rapidamente pela presença do O₂ que ativa a enzima prolil-hidroxilase (PHD), a qual hidroxila o HIF-1 α nos resíduos específicos de prolina, no domínio de degradação dependente do oxigênio (ODD- *oxygen-dependent degradation*). A hidroxilação destes resíduos promove a interação de alta afinidade entre HIF-1 α e a proteína do gene supressor de tumor, denominada de *von Hippel-Lindau* (VHL). A proteína VHL funciona como um substrato de reconhecimento para um complexo ubiquitina ligase E3, que adiciona a ubiquitina ao HIF-1 α , marcando-o para a degradação no proteossoma 26S, inibindo a sua ação (ELTZSCHIG; BRATTON; COLGAN, 2014; KAELIN; RATCLIFFE, 2008; KIM *et al.*, 2017).

Concomitantemente, a atividade de transcrição do *HIF-1 α* pode ser ainda inibida pela ação do fator de inibição do HIF-1, também chamado de FIH (do inglês, *Factor Inhibiting HIF-1*), uma hidroxilase de asparagina, dependente de O₂, Fe (II) e 2-oxoglutarato, que inibe o recrutamento das proteínas coativadoras p300 e CBP (CREB (*cyclic-AMP response element binding protein*) *Binding Protein*) e a função das subunidades HIF α (FIGURA 12) (GIRGIS *et al.*, 2012; KAELIN; RATCLIFFE, 2008; TANAKA; NANGAKU, 2009).

Em condições de hipóxia, ou perturbações no estado redox celular, as enzimas que hidroxilizam os HIF- α tornam-se inativas e a proteína HIF-1 α é estabilizada e não degradada, sendo translocada, então, para o núcleo celular, onde forma um complexo funcional heterodímero pela ligação com a subunidade β e coativadores específicos, CBP/p300 (HAMMOND *et al.*, 2014; NATH; SZABO, 2012). Por conseguinte, o HIF-1 α ativo se liga aos elementos responsivos à hipóxia (HRE) na região promotora dos genes alvo, podendo induzir a transcrição de aproximadamente 200 genes (FIGURA 12) (ELTZSCHIG; BRATTON; COLGAN, 2014; KAELIN; RATCLIFFE, 2008). À vista disso, o HIF-1 α é considerado um potencial marcador endógeno de hipóxia e doenças relacionadas ao déficit de O₂ (ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

Figura 12 – Esquema da regulação transcricional do *HIF-1 α* em condições de normóxia e hipóxia



Fonte: Modificado de Ortmann; Druker e Rocha (2014).

Em condições de normóxia, enzimas proil-hidroxilases (PHDs) e fatores de inibição de HIF (FIH) utilizam o oxigênio molecular como um cofator para a hidroxilação da subunidade HIF-1 α em resíduos de prolina e asparagina, respectivamente. A hidroxilação dos resíduos de prolina dentro do domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD) do HIF-1 α medeia a ligação do supressor tumoral *von Hippel-Lindau* (VHL) e promove a degradação do HIF-1 α pelo sistema ubiquitina-proteossoma. Em hipóxia, quando os níveis de oxigênio estão diminuídos, PHDs e FIH são inibidas e não ocorre a degradação do HIF-1 α que pode, então, formar dímeros com a subunidade HIF-1 β e se translocar para o núcleo celular. Sua ligação a elementos responsivos à hipóxia (HRE) nos promotores e acentuadores dos genes alvo permite a regulação da transcrição gênica.

2.3.2 Hipóxia e sinalização HIF-1 α na angiogênese fisiológica e patológica

Grande parte da morbimortalidade não infecciosa da AF é explicada por uma síndrome de vasculopatia crônica, cuja patobiologia geral é extremamente complicada e heterogênea, sendo responsável por lesões vasculopáticas em diversos órgãos, tais como: rins, baço, pênis, cordão umbilical e cérebro (HEBBEL; VERCELLOTTI; NATH, 2009). No geral, além do

desarranjo no fluxo normal do O₂ e de nutrientes, as complicações clínicas resultantes nessas áreas são o acometimento de AVC isquêmico, hipertensão e arteriopatia pulmonares, trombose, doença renal crônica, auto-esplenectomia, priapismo, perda fetal, retardo de crescimento e até o surgimento de novos vasos sanguíneos em resposta à hipóxia (HEBBEL; VERCELLOTTI; NATH, 2009; MUÑOZ-CHÁPULI, 2011).

A angiogênese, ou surgimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes, há muito tempo, é uma área ativa da pesquisa relacionada a tumores sólidos. No entanto, o interesse da comunidade científica hematológica em estudar os fenômenos da angiogênese começou apenas em 1997, quando um grupo de pesquisadores demonstrou que a medula óssea de crianças afetadas por leucemia linfoblástica aguda continha um número muito maior de microvasos que a medula óssea de crianças saudáveis (DI RAIMONDO *et al.*, 2001). Antes desse período, observações escassas foram relatadas na literatura, demonstrando um aumento da vascularização na medula de indivíduos portadores de outras doenças hematológicas, como policitemia vera, mieloma múltiplo e mielofibrose, porém, tais observações permaneciam isoladas e, aparentemente, sem associação (DI RAIMONDO *et al.*, 2001; THIELE *et al.*, 1992).

A angiogênese é reconhecida como o processo de crescimento e remodelação pelo qual um sistema vascular inicial é modificado para formar uma complexa rede ramificada frente à um déficit de O₂ (COSTA; INCIO; SOARES, 2007). É observada em uma ampla variedade de situações como constituinte fundamental de eventos biológicos heterogêneos, os quais abrangem desde o desenvolvimento embrionário, reprodução, reparo e cicatrização de feridas, até o crescimento de um tumor na vida adulta, por exemplo (DANESE *et al.*, 2006; FONG, 2008; KIMURA *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2014). Trata-se de um processo integrado de várias etapas que envolve a proliferação e migração de células endoteliais, a degradação e remodelação da matriz extracelular, a maturação funcional e anastomose dos ductos vasculares recém-formados (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; KIMURA *et al.*, 2000).

Fisiologicamente, a angiogênese é um processo fortemente regulado, resultante do equilíbrio de estímulos angiogênicos e angiostáticos, que funcionam de forma coordenada e sinérgica para desenvolver vasos sanguíneos funcionais e bem estruturados (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; KIMURA *et al.*, 2000). Contudo, a angiogênese também pode ser considerada como um processo prejudicial e patológico, fomentado pela manutenção de um desequilíbrio angiogênico duradouro que pode causar uma disfunção tecidual grave, implicada não somente na formação tumoral, mas também em uma variedade de doenças não neoplásicas e inflamatórias, como retinopatias, artrite reumatóide, inflamação das vias aéreas, úlceras

pépticas, hemangiomas, doença inflamatória intestinal, endometriose, psoríase, aterosclerose, doença de Alzheimer e outras doenças inflamatórias crônicas (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; KIMURA *et al.*, 2000; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; LOPES *et al.*, 2014).

Evidências sugerem que a angiogênese, a inflamação crônica e as respostas celulares às mudanças na tensão do O₂ são codependentes (DANESE *et al.*, 2006; ELTZSCHIG; BRATTON; COLGAN, 2014; LOPES *et al.*, 2014). Conjuntamente a isso, vários estudos ratificam a angiogênese como sendo, principalmente, uma resposta adaptativa à hipóxia tecidual (FONG, 2008; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016; WIGERUP; PAHLMAN; BEXELL, 2016), e a via de sinalização hipóxia/*HIF-1 α* , o principal mecanismo regulador da angiogênese (KROCK; SKULI; SIMON, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016; WIGERUP; PAHLMAN; BEXELL, 2016).

O *HIF-1 α* desempenha papéis críticos tanto na angiogênese fisiológica como na patológica, estimulando consideráveis mecanismos de controle homeostático que ligam o suprimento de O₂ à demanda metabólica no tecido local (HIROTA; SEMENZA, 2006).

Nas feridas ou injúrias isquêmicas, por exemplo, a lesão capilar gerada induz um ambiente hipóxico, e a oxigenação alterada pode induzir resposta angiogênica reconstrutiva ou reparativa, por meio da sinalização HIF (HIROTA; SEMENZA, 2006; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Já nos tumores, a disponibilidade de O₂ e nutrientes é limitada pela competição entre células em proliferação ativa, e a difusão de metabólitos é inibida pela alta pressão intersticial. Em resposta à hipóxia intratumoral, o *HIF-1 α* promove a transcrição de genes estimuladores da angiogênese para a formação de um novo suprimento sanguíneo a partir da vasculatura preexistente. Elevada expressão de *HIF-1 α* , portanto, está associada a mau prognóstico e doença metastática em vários cânceres, incluindo de cérebro, mama, cólon, cabeça e pescoço, fígado, pulmão, pele e pâncreas. Isso se deve em parte à resistência terapêutica, pois os tumores hipóxicos são refratários à radioterapia, uma vez que o O₂ molecular também é necessário para os efeitos citotóxicos da radiação ionizante. Adicionalmente a isso, a quimioterapia também é ineficaz em tumores hipóxicos devido à má distribuição de medicamentos pela rede vascular (CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; HIROTA; SEMENZA, 2006; KROCK; SKULI; SIMON, 2011).

A via hipóxia/HIF regula uma série de genes pró-angiogênicos que medeiam os principais aspectos da biologia das células de suporte endotelial, estromal e vascular, sendo o principal e mais estudado, porém não único, mediador angiogênico transcrito pelo *HIF-1 α* , o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*, do inglês, *vascular endothelial growth factor*)

(AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; CARMELIET; JAIN, 2011; WIGERUP; PAHLMAN; BEXELL, 2016).

Outros genes que promovem a neovascularização tecidual e também podem ser regulados positivamente pelo *HIF-1 α* , incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas- β (*PDGF- β*), angiopoietina-1 e 2 (*ANGPT*), fator de estroma-1 α (*SDF-1 α*), fator básico de crescimento de fibroblastos (*bFGF*) e fator de crescimento placentário (*PlGF*), dentre outros (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; WIGERUP; PAHLMAN; BEXELL, 2016). Tal amplitude de genes alvos pró-angiogênicos e de eventos subsequentes, faz do *HIF-1 α* um ‘regulador mestre’ da angiogênese (KROCK; SKULI; SIMON, 2011).

2.3.2.1 VEGF no contexto da hipóxia e anemia falciforme

O *VEGF*, fator de crescimento vascular mais potente e específico, é o regulador principal e o fator chave na angiogênese fisiológica e patológica humana (AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; EMING; KRIEG, 2006). Embora seja regulado, principalmente, pela transcrição do *HIF-1 α* , a expressão do *VEGF* também pode ser estimulada através do controle transcricional e da estabilidade do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), induzidos por vários outros fatores externos, incluindo fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, hormônios, estresse celular, oncogenes e biodisponibilidade de NO (AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; EMING; KRIEG, 2006; KIMURA *et al.*, 2000).

A proteína VEGF atua acoplando-se aos seus receptores de tirosina-quinase VEGFR-1 e VEGFR-2 para estimular as células endoteliais a produzirem metaloproteínas de matriz que degradam a membrana basal e a matriz extracelular circundante. Como resultado, as células endoteliais proliferam e migram para o interstício, onde começam a brotar. Posteriormente, os pericitos proliferam e migram para os brotos recém-formados, revestindo os novos vasos. Além disso, o gene *VEGF* também é o principal fator envolvido na mobilização de células progenitoras endoteliais da medula óssea para a circulação periférica e para os locais angiogênicos, onde se diferenciam e se integram à neovasculatura (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; HIROTA; SEMENZA, 2006; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; NILLESEN *et al.*, 2007).

Não obstante, evidências recentes têm associado alterações nas concentrações de VEGF em várias doenças, tais como enfisema pulmonar, retinopatia diabética, perda idiopática recorrente da gravidez, diferenciação tumoral e doenças inflamatórias (AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; CARMELIET; JAIN, 2011; COSTA; INCIO; SOARES, 2007; GÜRKAN;

TANNVERDI; BAŞLAMIŞLI, 2005; KROCK; SKULI; SIMON, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016). Vale ressaltar que apesar de ser reconhecidamente considerada como uma doença de cunho inflamatório e de hipóxia, não há muitos relatos na literatura sobre a AF e a participação do VEGF nos mecanismos de sua fisiopatologia e tratamento. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado níveis elevados de VEGF e PlGF (membro da família VEGF) em pacientes com AF, e proposto uma correlação positiva entre a expressão de *VEGF* e a patogênese das complicações inflamatórias da AF, em particular das CVO e vasculopatias (AL-HABBOUBI *et al.*, 2012; GÜRKAN; TANRIVERDI; BAŞLAMIŞLI, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.3.3 Hipóxia e instabilidade genética

A sobrevivência dos organismos e perpetuação das espécies depende da transmissão precisa de informações genéticas de uma célula-mãe para suas filhas. Essa transmissão fiel requer não apenas extrema precisão na replicação do DNA e precisa distribuição cromossômica, como também a capacidade de sobreviver a danos espontâneos e induzidos ao DNA, minimizando o número de mutações hereditárias (ZHOU; ELLEDGE, 2000).

O dano à integridade do material genético humano representa uma ameaça contínua à nossa capacidade de transmitir fielmente informações genéticas aos nossos filhos, bem como à nossa própria sobrevivência (BORGES; LINDEN; WANG, 2008; CICCIA; ELLEDGE, 2010; ZHOU; ELLEDGE, 2000). Desde a descoberta da estrutura do DNA, há mais de 60 anos, os notáveis mecanismos que preservam as informações genéticas codificadas pelo DNA e garantem sua transmissão autêntica através das gerações têm sido objeto de extensa investigação. Para manter a integridade genômica, as células desenvolveram mecanismos de vigilância que monitoram a estrutura dos cromossomos e coordenam o reparo e a progressão do ciclo celular para garantir que o DNA seja protegido contra danos induzidos por agentes ambientais ou exôgenos (por exemplo, produtos químicos, luz ultravioleta, radiação) ou por agentes endógenos, gerados espontaneamente durante o metabolismo celular (por exemplo, espécies reativas de oxigênio) (CICCIA; ELLEDGE, 2010; GATALICA *et al.*, 2011; WU; MIYAMOTO, 2008).

As lesões produzidas no DNA, se não forem corretamente reparadas, podem conduzir ao acúmulo de mutações em genes cruciais para o metabolismo e crescimento celular normais, os quais, quando desregulados, poderão contribuir para a gênese de diversas doenças (BORGES; LINDEN; WANG, 2008; HOEIJMAKERS, 2009; PIRES *et al.*, 2010a).

As consequências biológicas de alterações químicas e/ou estruturais na molécula de DNA resultam, primariamente, dos possíveis efeitos de sua presença durante reações metabólicas normais às quais o DNA está sujeito, especialmente na replicação e transcrição. A replicação e transcrição de DNA contendo lesões pode induzir mutações pontuais (substituição ou deleção de bases, inserção ou exclusão de códons de paradas de síntese proteica ou de síntese de proteínas truncadas tóxicas, por exemplo) que podem contribuir para a morte celular, processos de carcinogênese, envelhecimento, doenças relacionadas à senescência e neurodegeneração (CROSBY *et al.*, 2009; OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010).

Muitos estudos sobre as respostas de sinalização induzidas por hipóxia se concentraram no papel do *HIF-1 α* e na angiogênese. Todavia, evidências também apoiam o conceito de que a hipóxia pode conduzir e manter a instabilidade genética e um fenótipo mutador (BRISTOW; HILL, 2008; GATALICA *et al.*, 2011; SWARTZ *et al.*, 2002). Contudo, ainda pouco se sabe sobre a relação exata entre reparo de DNA e instabilidade genética em células hipóxicas (KUMARESWARAN *et al.*, 2012).

Sendo um componente chave dos tumores sólidos, a hipóxia pode impulsionar a sobrevivência, progressão e metástase do câncer através de seu impacto na integridade genômica e transcrição de inúmeros genes relacionados à fisiologia e metabolismo celular. Além disso, também pode induzir novas alterações moleculares e promover e/ou exacerbar um fenótipo maligno, em muitos casos, pela ação do fator de transcrição *HIF-1 α* (GLAZER *et al.*, 2013; KUMARESWARAN *et al.*, 2012). Outrossim, muitos genes também são ativados ou suprimidos sob estresse hipóxico, por meio de mecanismos independentes do sistema HIF (GLAZER *et al.*, 2013).

A instabilidade genética pode surgir em função da resistência mediada pela hipóxia à apoptose e à diminuição do reparo do DNA, levando a possíveis taxas aumentadas de mutagênese e alteração da biologia da cromatina. Isso pode ser particularmente verdadeiro nas células em proliferação que se adaptaram à baixos níveis de O₂ e continuam a proliferar, mesmo no contexto de reparo comprometido da molécula do DNA (BRISTOW; HILL, 2008).

Há evidências crescentes de que, na tentativa de se adaptar às situações de hipóxia, as células reprimem processos celulares que envolvem alto consumo de energia. Sob condições hipóxicas, muitos componentes essenciais das vias de reparo do DNA demonstram estar reprimidos (HAMMOND *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2010b). Entretanto, estima-se que cada célula de nosso organismo pode sofrer até 10⁵ lesões espontâneas diariamente (HOEIJMAKERS, 2009), e para combater essas ameaças, a via de resposta a danos no DNA precisa estar muito bem preparada e exequível para detectar os prováveis danos ao DNA e o

estresse na replicação, e traduzir essas informações à célula para influenciar um arsenal de ferramentas enzimáticas capazes de remodelar e reparar o DNA e evitar alterações desnecessárias e potencialmente deletérias em sua estrutura (CICCIA; ELLEDGE, 2010; GLAZER *et al.*, 2013).

A resposta celular ao dano no DNA pode ser, então, dividida em três partes fundamentais: detectar o tipo de dano (ativação de *checkpoints* (verificação) de ciclo celular), ativar as vias de sinalização do dano no DNA e reparar o dano (BENCOKOVA *et al.*, 2009; WU; MIYAMOTO, 2008).

Alguns pesquisadores têm demonstrado que as vias de sinalização de dano no DNA são iniciadas tanto em resposta à hipóxia quanto em resposta à reoxigenação após hipóxia (AUFRADET *et al.*, 2013; BENCOKOVA *et al.*, 2009). Quando uma célula atinge um nível de hipóxia que induz à parada de replicação, ela também entra em um estado em que é difícil manter os níveis normais de proteínas, e a energia precisa ser reservada. A transcrição e transdução global são reprimidas nessas tensões de O₂. A consequência indesejável disso é que, se uma célula se torna reoxigenada, como, por exemplo, após melhora do fluxo sanguíneo, ela pode sofrer severos danos induzidos por ERO geradas durante a reoxigenação, porém, essa célula não possui o mecanismo adequado e disponível para repará-la (BENCOKOVA *et al.*, 2009; GLAZER *et al.*, 2013).

Os ciclos de hipóxia-reoxigenação, além de gerarem ERO capazes de causarem danos ao DNA da célula (especialmente em decorrência da reoxigenação), de induzirem mutagênese, quebra nas fitas de DNA e comprometerem funcionalmente as vias de reparo do DNA, também estão associados à amplificação de genes e à replicação excessiva de DNA, embora os mecanismos pelos quais eles ocorram ainda não tenham sido totalmente compreendidos (BRISTOW; HILL, 2008; GLAZER *et al.*, 2013). Essas alterações genéticas podem ativar ainda mais oncogenes ou inativar genes supressores de tumores, dando origem a um fenótipo mutador obscuro e sem precedentes (CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; GLAZER *et al.*, 2013; HOEIJMAKERS, 2009).

A resposta aos danos no DNA induzida por hipóxia é distinta das vias clássicas induzidas por agentes genotóxicos exógenos (irradiação, produtos químicos, etc.), principalmente devido à falta de dano detectável ao DNA (no caso da hipóxia), em muitos casos, como também devido à repressão concomitante do reparo do DNA (BRISTOW; HILL, 2008; KUMARESWARAN *et al.*, 2012; OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010).

2.3.3.1 Mecanismos de reparo de dano ao DNA

O reparo do DNA é realizado por uma infinidade de atividades enzimáticas que modificam quimicamente o DNA para reparar os danos existentes em sua estrutura. Participam desta tarefa de reparo, enzimas como as nucleases, helicases, polimerases, topoisomerases, recombinases, ligases, glicosilases, desmetilases, quinases e fosfatases. Essas ferramentas de reparo devem ser reguladas com precisão porque cada uma por si só pode causar estragos na integridade do DNA se for mal utilizada ou tiver permissão para acessar o DNA no momento ou local inadequados (CICCIA; ELLEDGE, 2010).

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias para tolerar ou reparar danos causados no material genético celular. Os mecanismos de reparo do DNA são geralmente divididos em cinco categorias, com subdivisões em muitas delas de acordo com o tipo de lesão que foi acometida a fita de DNA. Destacam-se, dentre eles, o reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por erro de emparelhamento (MMR), recombinação homóloga (HR) e a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (GLAZER *et al.*, 2013; HAMMOND *et al.*, 2014; OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010; ZHOU; ELLEDGE, 2000). Entretanto, tais mecanismos demonstram ser menos eficazes em condições hipóxicas, sugerindo que uma resposta geral à hipóxia é a restrição do reparo do DNA, através de maquinismos variados que incluem papéis para o *HIF-1 α* , micro-RNAs e modificações epigenéticas (GLAZER *et al.*, 2013; HAMMOND *et al.*, 2014; LESZCZYNSKA *et al.*, 2016; OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010).

Em geral, o mecanismo de reparo de danos no DNA é uma via de transdução de sinal, cujas proteínas envolvidas atuam como sensores, transdutores e efetores de respostas às lesões no DNA (BENCOKOVA *et al.*, 2009; ZHOU; ELLEDGE, 2000). Apesar de nos referirmos a esse processo como um caminho, ele é descrito com mais precisão como uma rede de caminhos interconectados que, juntos, executam a resposta ao dano (ZHOU; ELLEDGE, 2000). As proteínas sensoras, que detectam inicialmente alterações na estrutura do DNA e iniciam o processo de sinalização, ainda não são completamente conhecidas, mas evidências mostram que o complexo MRE11 – RAD50 – NBS1 (MRN), complexo Rad9-Rad1-Hus1, ATRIP (ATR-interacting protein), a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) têm sido propostos como sensores de danos ao DNA (KUMARESWARAN *et al.*, 2012; WU; MIYAMOTO, 2008; ZHOU; ELLEDGE, 2000).

Sabe-se que a quebra da dupla fita do DNA (DNA-DSB, do inglês, *double-strand breaks*) está entre as lesões mais danosas que podem desafiar a integridade genômica, e seu

reparo depende principalmente das vias HR e NHEJ (CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; CUADRADO *et al.*, 2006; KUMARESWARAN *et al.*, 2012; LESZCZYNSKA *et al.*, 2016). Uma vez presente no DNA, se a DNA-DSB não for imediatamente reparada, ou for reparada incorretamente, pode resultar em deleções cromossômicas, translocações, ampliações, aneuploidias e instabilidade genética (KUMARESWARAN *et al.*, 2012).

Apesar do fato dos ciclos de hipóxia/reoxigenação estarem associados tanto com a indução de danos de DNA-DSB quanto com a repressão do reparo e diminuição da sensibilidade à apoptose, pouco se sabe sobre os efeitos potenciais da hipóxia contínua na detecção e processamento do DNA-DSB *in vivo*. De modo igual, ainda é muito escasso o conhecimento da real contribuição da hipóxia aguda *vs* crônica em indivíduos humanos, bem como essas informações podem alterar a resposta à terapia clínica em patologias com um microambiente dinâmico, como é o caso da AF (CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; KUMARESWARAN *et al.*, 2012).

Concomitante à identificação desse tipo de lesão (DNA-DSB), uma cascata de sinalização rápida deve ser coordenada no local do dano, levando à ativação de *checkpoints* do ciclo celular e/ou apoptose, que, por sua vez, ajudam a recrutar e ativar as duas principais quinases capazes de transdução de sinais de dano ao DNA (CICCIA; ELLEDGE, 2010; WU; MIYAMOTO, 2008). Neste contexto, a ataxia telangiectasia mutada (ATM, do inglês, *ataxia telangiectasia mutated*) e ataxia telangiectasia e Rad3 relacionados (ATR, do inglês, *ataxia telangiectasia and Rad3 related*) são as primeiras moléculas de sinalização conhecidas por iniciar a cascata de transdução em locais de danos (CUADRADO *et al.*, 2006; WU; MIYAMOTO, 2008).

2.3.3.2 ATM e ATR no contexto da hipóxia e anemia falciforme

A ATM e ATR são membros da família de proteínas- Fosfatidilinositol 3-quinase relacionada à quinases (PIKK) e são consideradas proteínas centrais para todas as respostas a danos no DNA, atuando no desencadeamento da cascata de fosforilação e transdução e na coordenação de *checkpoints* do ciclo celular (CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; CUADRADO *et al.*, 2006; KUMARESWARAN *et al.*, 2012).

Vale a pena ressaltar que, atualmente, entende-se como *checkpoint* do ciclo celular, a via regulatória que além de controlar a capacidade das células de interromperem o ciclo celular em resposta a algum dano no DNA, permitindo tempo para o reparo, também demonstra controlar a ativação das vias de reparo, a composição e o comprimento da cromatina telomérica,

o movimento das proteínas de reparo para os locais de dano ao DNA, a ativação de programas transcricionais, bem como a indução de morte celular por apoptose (ZHOU; ELLEDGE, 2000).

Embora um terceiro membro PIKK, a proteína DNA-PK, também possa fosforilar certas proteínas de resposta a danos ao DNA em virtude de DNA-DSB, sua ação parece mais restrita ao local da ruptura e não na coordenação de uma resposta celular global (CUADRADO *et al.*, 2006).

A exposição à hipóxia/reoxigenação pode induzir danos à molécula do DNA ou causar estresse de replicação que, por sua vez, dará início a uma resposta a danos no DNA que inclui a ativação/sinalização mediada por *ATM* e *ATR* (OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010), resultando em paradas do ciclo celular nas fases S e G2. Porém, evidências também atribuem à hipóxia prolongada, a parada do ciclo celular na fase G1 (BRISTOW; HILL, 2008; CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; CUADRADO *et al.*, 2006; HAMMOND *et al.*, 2014). Essa ativação pode ocorrer mesmo na ausência de danos no DNA e pode depender do nível de O₂ ou tipo de célula envolvida (BENCOKOVA *et al.*, 2009; CUADRADO *et al.*, 2006; KUMARESWARAN *et al.*, 2012).

Uma vez ativadas, a *ATM* e *ATR* fosforilam um vasto número de proteínas efetoras a jusante, como as quinases Chk1 e Chk2, e seus homólogos (que regulam a parada do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose, transcrição de genes e senescência) (HAMMOND *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2010a; WU; MIYAMOTO, 2008; ZHOU; ELLEDGE, 2000), a histona H2AX (BENCOKOVA *et al.*, 2009; KUMARESWARAN *et al.*, 2012) e o gene supressor de tumor p53 (que pode levar à apoptose induzida por hipóxia) (HAMMOND *et al.*, 2014; LESZCZYNSKA *et al.*, 2016).

Os genes *ATM* e *ATR* também podem ser ativados em resposta ao tratamento farmacoterapêutico com agentes estressores de replicação, como a hidroxiuréia (HU) e afidicolina (HAMMOND; GIACCIA, 2004; KUROSE *et al.*, 2006; WU; MIYAMOTO, 2008). Vale salientar, todavia, que a HU é o principal medicamento utilizado para o tratamento de pacientes com AF e também é um quimioterápico antitumoral, potencialmente inibidor da ribonucleotídeo redutase, enzima essencial para a síntese de novas cadeias de DNA, interrompendo, portanto, a replicação do DNA na fase S do ciclo celular e tendo seu uso também associado a danos de DNA-DSB (ANSARI; GAVINS, 2019; KUROSE *et al.*, 2006; PICCIN *et al.*, 2019).

2.4 Diagnóstico, triagem e prevenção

Sendo a AF uma doença relacionada à uma alteração na molécula de Hb, a sua identificação e diagnóstico são relativamente simples, já que a Hb é a proteína mais abundante presente no sangue humano e existirem confiáveis técnicas capazes de detectar a presença da Hb S e outras variantes (NAIK; HAYWOOD, 2015; WARE *et al.*, 2017).

Os objetivos e métodos de diagnóstico da doença variam de acordo com a idade do indivíduo. Em geral, podemos dividir os testes de investigação, de forma didática, conforme quatro períodos que se sobrepõem: preconcepção (ou pré-marital), pré-natal, neonatal e pós-neonatal (KATO *et al.*, 2018; LOBITZ *et al.*, 2018).

Segundo Hoppe (2013), os testes de preconcepção são destinados a identificar potenciais pais assintomáticos, cuja descendência estaria em risco de ser acometida de DF. Técnicas laboratoriais usadas para testes de preconcepção são métodos básicos de rotina de química proteica que permitem a separação de espécies de Hb, de acordo com sua estrutura proteica. Estes testes incluem a eletroforese de Hb, cromatografia líquida de alta performance (HPLC- *High performance liquid chromatography*) (HOPPE, 2013; WARE *et al.*, 2017) e a focalização isoelétrica (que permite a separação de moléculas, de acordo com seu comportamento como ácidos e bases fracas, através de seus distintos pontos isoelétricos) (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

O diagnóstico pré-natal é um procedimento geralmente seguro, mas invasivo, e é oferecido durante a gravidez precoce a casais que tiveram resultado positivo na triagem de preconcepção. Ele requer amostras de DNA fetal obtidas a partir de análise de vilosidades coriônicas realizada com 09 (nove) semanas de gestação (HOPPE, 2013). Técnicas não invasivas de diagnóstico pré-natal estão sendo desenvolvidas, mas ainda estão sendo aprimoradas. Essas novas técnicas podem detectar o DNA fetal na circulação materna em até 4 semanas de gestação. Para os casais, cujos testes na preconcepção tenham dado positivo para Hb S, e optam pela fertilização *in vitro*, também podem dispor da triagem genética pré-implantação para se identificar embriões saudáveis e em risco, antes da transferência para a placenta materna (TRAEGER-SYNODINOS, 2017).

A triagem neonatal para as doenças falciformes é realizada ao nascimento, antes que os sintomas comecem a aparecer, utilizando, para isso, metodologias de análise da proteína de Hb (KATO *et al.*, 2018; NAIK; HAYWOOD, 2015; BRASIL, 2002a). Dois tipos de programas de triagem neonatal têm sido utilizados: a triagem seletiva de bebês de pais de alto risco (triagem

direcionada) e a triagem universal (LOBITZ *et al.*, 2018; PIEL *et al.*, 2013; ROBITAILLE; DELVIN; HUME, 2006).

Enquanto a triagem direcionada leva em conta a ancestralidade do RN, sendo restrita a bebês cujas famílias parenterais são de origens de grupos étnicos “de risco”, a triagem universal é oferecida a toda a população de RN, independentemente das origens familiares (LOBITZ *et al.*, 2018). Ao compararmos os dois tipos de triagem neonatal supracitados, a designada ‘universal’ possui mais vantagens custo-efetivas, uma vez que esta identifica mais RN com doenças e, conseqüentemente, previne mais mortes (PIEL *et al.*, 2013; ROBITAILLE; DELVIN; HUME, 2006).

De acordo com Vichinsky *et al.* (1988), em áreas sem programas de triagem neonatal, o diagnóstico inicial da AF ocorre aproximadamente aos 21 meses de idade, em decorrência do aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença, geralmente, uma infecção fatal ou uma crise aguda de sequestro esplênico. Ainda segundo os mesmos pesquisadores, o diagnóstico precoce, acompanhado de profilaxia com penicilina e educação familiar, reduz a mortalidade nos primeiros 05 (cinco) anos de vida de 25% para menos de 3%.

A exigência de testes pós-neonatais para AF é influenciada por vários fatores que afetam o conhecimento da população em geral sobre seu estado de portador da Hb S ou não. Tais fatores incluem a eficiência regional de rastreamento dos programas de triagem neonatal, a imigração de pacientes de risco não testados anteriormente, principalmente pela globalização dos fluxos migratórios, e o acesso a resultados neonatais em pacientes idosos (LOBITZ *et al.*, 2018; NAIK; HAYWOOD, 2015; BRASIL, 2002a). A HbAS, por exemplo, é uma condição benigna e não uma doença, mas também é um fator de risco para complicações graves incomuns (NAIK; HAYWOOD, 2015).

Com a finalidade inicial da prevenção de doença mental em RN, a triagem neonatal, criada nos Estados Unidos, a partir da década de 50, é uma ação preventiva que permite rastrear e detectar diversas patologias logo ao nascimento, sendo realizada por meio do ‘teste do pezinho’ em população com idade de 0 (zero) a 30 dias (preferencialmente entre o 2º e o 7º dia de vida) (BRASIL, 2002b).

No Brasil, a triagem neonatal – Teste do Pezinho – foi incorporada, pelo Governo Federal, ao Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 1992, pela Portaria GM/MS n.º 22, de 15 de janeiro de 1992, com uma legislação que determinava a obrigatoriedade do teste em todos os RN vivos, porém, incluía apenas a investigação da fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito (BRASIL, 2002b). Todavia, em 2001, o Ministério da Saúde empenhou-se na

reavaliação da Triagem Neonatal no SUS, o que culminou na publicação da portaria GM/MS n.º 822, criando o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (BRASIL, 2002b).

Dentre os principais objetivos da implantação do PNTN brasileiro, frisam-se a ampliação da cobertura de patologias triadas, incluindo agora a detecção precoce de outras doenças congênitas como as DF, outras hemoglobinopatias e a fibrose cística; a busca da cobertura universal do programa e a definição de uma abordagem mais ampla da questão, determinando que o processo de triagem neonatal envolva várias outras etapas, desde a realização do exame laboratorial, detecção precoce de patologias, a busca ativa dos casos suspeitos, a confirmação diagnóstica, o tratamento e acompanhamento multidisciplinar especializado dos pacientes e ainda a criação de um sistema de informações que permita cadastrar todos os pacientes em um banco de dados nacional (BRASIL, 2002b).

Dados de 2017 relatam que apesar de o PNTN esteja disponível para todos os 26 estados brasileiros, a cobertura de assistência à população ainda é altamente variável, oscilando, por exemplo, entre a abrangência de quase 100% dos hospitais no estado de Minas Gerais, e cerca de apenas 55% dos hospitais no estado do Amapá (KATO *et al.*, 2018).

A legislação brasileira, conforme decretos e portarias que criaram e sustentam o PNTN, garantem o auxílio ao diagnóstico e todo suporte após ele, não somente ao indivíduo acometido pela AF, mas também ao indivíduo que é portador do traço falciforme, cabendo a este receber igualmente toda orientação e informações relevantes à sua condição genética, e ter disponível o aconselhamento genético para si e seu cônjuge, se assim o desejar.

2.5 Estratégias terapêuticas

Não obstante a AF ter sido mencionada pela primeira vez há mais de um século e dos notáveis avanços na compreensão de sua complexa base fisiopatológica, grandes disparidades ainda são observadas no desenvolvimento de terapias para tratar e cuidar do paciente, em relação às outras patologias, especialmente em decorrência ao limitado investimento da indústria farmacêutica e ensaios clínicos marginais (ANSARI; GAVINS, 2019).

Apesar da descoberta da natureza molecular da doença e dos vastos e consideráveis danos aos órgãos e sistemas por ela ocasionados, as opções de tratamento ainda são limitadas e nenhum medicamento específico para o seu tratamento fora desenvolvido, até então; sendo utilizados medicamentos de uso em outras doenças, essencialmente, apenas para aliviar os sintomas e/ou para tentar evitar complicações mais graves (ANSARI *et al.*, 2018; NASCIMENTO-JR; MELO, 2012).

No entanto, intervenções terapêuticas diversas têm sido aplicadas com um resultado animador, onde o diagnóstico precoce da doença, bem como os avanços nos cuidados médicos gerais e o uso de opções terapêuticas vigentes, tem induzido estudos mais abrangentes com diversas substâncias e promovido melhorias substanciais tanto na expectativa de vida como no bem-estar dos pacientes (GARDNER *et al.*, 2016). Medidas educacionais e preventivas, como a antibioticoprofilaxia durante a infância, a rotina de imunizações e vacinação precoces contra pneumococos e hepatites virais e a utilização de medicamentos para o manejo da crise dolorosa aguda com analgesia e hidratação adequadas, tais como o ácido fólico, anti-inflamatórios e analgésicos, têm sido introduzidos e utilizados com êxito na padronização de protocolos de cuidado ao paciente falciforme (GARDNER *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2018; STEINBERG, 2008).

A expectativa de vida melhorou significativamente em países de alta renda nos últimos 40 anos. Em 1973, por exemplo, a expectativa de vida de um paciente com AF era de apenas 14 anos (CLASTER; VICHINSKY, 2003). Atualmente, com os avanços no manejo da doença e instalação de hospitais-dia, a perspectiva de sobrevida destes pacientes pode atingir, em média, 49 anos (com variação de 44,9 – 68,6 anos), com percentual de sobrevida maior entre as mulheres que nos homens (MAITRA *et al.*, 2017). Entretanto, a expectativa de vida desses pacientes ainda é reduzida em mais de 2 décadas em relação à população em geral (GARDNER *et al.*, 2016) e os cuidados de rotina e emergência para indivíduos com AF têm grandes custos financeiros, a qualidade de vida se deteriora com frequência durante a vida adulta e os efeitos sociais e psicológicos da doença em indivíduos afetados e seus familiares permanecem subestimados (ANIE, 2005).

Além disso, a maioria desses avanços não atingiu países de baixa renda, e muitos desses pacientes encontram elevada limitação de acessibilidade até mesmo aos medicamentos mais básicos e paliativos para a analgesia ou hidratação, como no caso de muitos países da África, onde a porcentagem de disponibilidade de medicamentos para o tratamento chega próximo a zero (ANIE, 2005; KATO *et al.*, 2018; WEATHERALL, 2010).

De acordo com Almeida (2011), as estratégias terapêuticas utilizadas e desenvolvidas para o tratamento da AF são baseadas em três pontos fundamentais: o primeiro seria diminuir a concentração intracelular de Hb S com agentes que ativem a síntese de Hb F ou que impeçam a falcização do eritrócito; o segundo, seria diminuir os eventos de adesão celular e, conseqüentemente, a vaso-oclusão; e o terceiro ponto seria reduzir o processo inflamatório e o estresse oxidativo.

2.5.1 Opções terapêuticas vigentes

As opções terapêuticas atuais para o tratamento da AF ainda são extremamente limitadas (TORRES; CONRAN, 2019; TSHILOLO *et al.*, 2019). Além da prevenção de episódios vasculocclusivos e de complicações falciformes agudas e crônicas, como STA e lesão de órgãos, o principal desafio continua sendo o manejo da dor aguda que afeta a maioria dos pacientes e pode resultar em hospitalizações constantes e incapacitação para atividades diárias básicas (TORRES; CONRAN, 2019).

As três principais terapias aceitas mundialmente e que, de fato, modificam o curso da AF são a hidroxiuréia (HU), a transfusão de eritrócitos (transfusão sanguínea) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) (KATO *et al.*, 2018; TORRES; CONRAN, 2019). Embora seu uso não seja ainda tão difundido, recentemente, foi aprovado o uso da L-Glutamina para o tratamento da AF, porém, muitos de seus estudos clínicos ainda não foram divulgados (ANSARI; GAVINS, 2019; TORRES; CONRAN, 2019) e a acreditação solidificada pelos profissionais de saúde e pacientes ainda precisa ser alcançada com mais afinco.

2.5.1.1 A Hidroxiuréia, 'padrão ouro' de tratamento

A hidroxiuréia (HU, ou hidroxycarbamida) é, até o presente momento, o avanço mais importante no tratamento do paciente com AF e considerada a mais promissora dentre as terapias disponíveis que, efetivamente, tem forte impacto na melhora da qualidade de vida dos pacientes (MATTE *et al.*, 2019; PICCIN *et al.*, 2019).

Trata-se de um agente quimioterápico sintetizado em 1869, na Alemanha, por Dresler e Stein (DRESLER; STEIN, 1869), porém, apenas um século após, mais especificamente em 1967, este medicamento foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) norte-americano para o tratamento de doenças neoplásicas, e, nos anos subsequentes, para o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica, psoríase, doenças reumáticas e policitemia vera, dentre outras (STEVENS, 1999). Em 1998, passou a fazer parte do arsenal terapêutico para pacientes falciformes, sendo aprovada pelo FDA e introduzida nos protocolos de conduta para manejo da AF (MATTE *et al.*, 2019; TORRES; CONRAN, 2019). Em 2007, foi aprovada para tal finalidade pela *European Medicines Agency* (EMEA), vindo a ser o único medicamento, até o momento, aprovado pelas duas maiores agências reguladoras de medicamentos do mundo para o tratamento da doença (MATTE *et al.*, 2019; TORRES; CONRAN, 2019). No Brasil, a portaria de nº 872, de 06 de novembro de 2002, do Ministério

da Saúde, aprovou a introdução da HU no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Doença Falciforme (CANÇADO *et al.*, 2009), tornando-se, tanto nas diretrizes nacionais como nas internacionais, o ‘padrão ouro’ de tratamento para pacientes com DF (LUZZATTO; MAKANI, 2019; MATTE *et al.*, 2019).

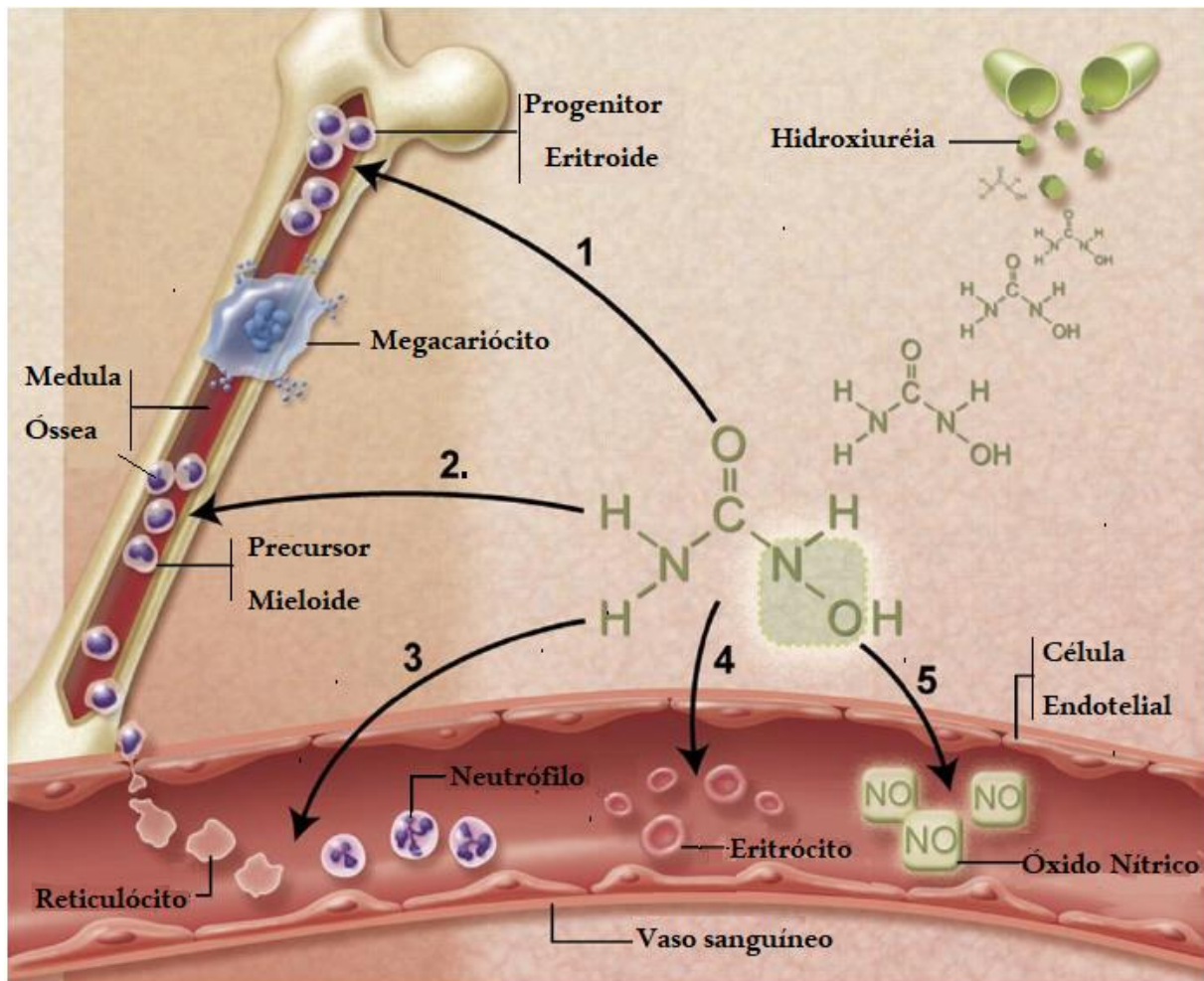
A constatação de que valores aumentados de Hb F previnem várias complicações da AF fez com que a HU despertasse o interesse de muitos pesquisadores. Embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente elucidado, este medicamento possui a habilidade de aumentar a síntese intraeritrocitária de Hb F, o que reduz a polimerização da Hb S e, dessa maneira, as crises dolorosas de vaso-oclusão, os eventos hemolíticos, a ocorrência de STA e, possivelmente, os eventos neurológicos agudos (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005; LUZZATTO; MAKANI, 2019; TSHILOLO *et al.*, 2019).

Evidências sugerem que o mecanismo pelo qual a HU induz a produção de Hb F deve-se ao fato deste medicamento possuir ação citostática e promover o bloqueio da síntese do DNA pela inibição da ribonucleotídeo redutase, mantendo as células em fase S do ciclo celular (BALLAS, 2018; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018; TORRES; CONRAN, 2019). Entretanto, muitos pacientes em tratamento apresentam melhora clínica mesmo antes de um aumento significativo da concentração de Hb F, ou até mesmo nem sofrem alteração em sua concentração, sugerindo que a indução de Hb F, isoladamente, não pode explicar todo o efeito benéfico do tratamento e que outras ações do medicamento possam estar envolvidas (CANÇADO *et al.*, 2009; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018; TSHILOLO *et al.*, 2019).

Sabe-se, contudo, que a HU também atua induzindo um aumento na concentração de Hb total e volume corpuscular médio (VCM), além de promover redução no número de reticulócitos, plaquetas e leucócitos e na viscosidade sanguínea. Dessa maneira, o uso da HU está associado a um melhor estado de hidratação eritrocitária e redução da rigidez celular e de eventos hemolíticos e oclusivos (CANÇADO *et al.*, 2009; MATTE *et al.*, 2019).

A figura 13 apresenta alguns mecanismos de ação e células alvo que envolvem os efeitos da HU.

Figura 13 - Mecanismo de ação envolvendo os efeitos benéficos da Hidroxiuréia na anemia falciforme



Fonte: Adaptado de Ware (2010).

(1) Induz a síntese de hemoglobina fetal no compartimento eritrocitário e altera a cinética eritrocitária; (2) promove citotoxicidade medular e diminuição na contagem de neutrófilos e reticulócitos; (3) diminui a expressão de moléculas de adesão e a adesividade celular, e melhora a reologia dos neutrófilos e reticulócitos circulantes, com subsequente diminuição de danos endoteliais; (4) Induz a macrocitose e hidratação eritrocitária que promovem a redução da falcização intracelular e hemólises; (5) aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico, com potencial vasodilatação local e melhora da resposta vascular.

Outra resposta favorável deste medicamento tem sido a diminuição da expressão de moléculas de adesão, e proteínas receptoras, na superfície de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e células endoteliais, com conseqüente redução da adesão celular e de obstruções vasculares (PICCIN *et al.*, 2019; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018). Além disso, a HU promove a redução de interações de hipercoagulabilidade, modula mecanismos inflamatórios e aumenta a síntese e biodisponibilidade de NO pela ativação da guanilil ciclase, visando a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (CANÇADO *et al.*, 2009; MATTE *et al.*, 2019; TORRES; CONRAN, 2019).

Pelo exposto, podemos depreender que a HU reduz significativamente a incidência de CVO, dores agudas e STA (PICCIN *et al.*, 2019; TORRES; CONRAN, 2019), minimiza o número de admissões hospitalares, tempo de internação e a necessidade de transfusões sanguíneas (BALLAS, 2018; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018). A HU também está associada à redução da incidência e gravidade da dactilite e da doença cerebrovascular progressiva, além de demonstrar, de maneira contundente, prevenir danos em órgãos-alvo, induzir sobrevida prolongada dos pacientes e redução no número de óbitos decorrentes de complicações da AF (CANÇADO *et al.*, 2009; KATO *et al.*, 2018; MATTE *et al.*, 2019).

A HU possui o benefício de ser de administração oral, disponível em cápsulas de 500 mg ou em formulações líquidas pediátricas (FERNANDES, 2017). É de rápida absorção, atingindo nível plasmático máximo entre 20-30 minutos, em respondedores rápidos, e em cerca de 60 minutos, em respondedores lentos. Apresenta uma meia-vida plasmática de três a quatro horas, sendo metabolizada no fígado e excretada por via renal (80%) (CANÇADO *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2018). A dose recomendada varia de 15-30 mg/Kg/dia, não devendo exceder a dose máxima tolerada (DMT) estimada em 35 mg/Kg/dia, para indivíduos adultos (BRAWLEY *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009; LANZKRON *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2018). Ensaios controlados randomizados demonstraram que 85-90% dos pacientes infantis são capazes de tolerar bem uma DMT de aproximadamente 20 mg/dia (FERNANDES, 2017).

O tratamento deve ser de, pelo menos, dois anos e mantido por tempo indeterminado, de acordo com a resposta laboratorial e evolução clínica do paciente, exceto no período gestacional e puerperal. Importante considerar que cerca de 25% dos pacientes não apresentam melhora com HU e, portanto, nestes casos, o tratamento deve ser descontinuado (CANÇADO *et al.*, 2009). Também é imprescindível uma monitoração laboratorial (hemograma, contagem de reticulócitos e plaquetas, sorologias: hepatites B e C e HIV, dosagens de uréia, bilirrubinas e transaminases hepáticas, creatinina, LDH, etc.) antes de iniciar o tratamento e durante o mesmo, a fim de obter a DMT individual, avaliar a resposta do quadro clínico do paciente e monitorar o estresse hematopoiético imposto pelo medicamento (BRAWLEY *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2018).

Diferentes estudos identificaram múltiplos fatores envolvidos na não resposta benéfica do tratamento com HU por alguns pacientes, cuja principal limitação elencada, além de razões farmacogenômicas, é a baixa adesão de pacientes adultos à terapia, destacando-se dentre os principais motivos: (1) a cronicidade do tratamento; (2) razões socioeconômicas; e (3) barreiras de adesão relacionadas à transição do sistema pediátrico para o cuidado adulto (KATO *et al.*, 2018; MATTE *et al.*, 2019).

Normalmente, o efeito do tratamento começa a ocorrer dentro de semanas; entretanto, certos mecanismos celulares específicos, como diminuição da contagem de leucócitos e síntese de Hb F, podem levar até 6 meses para serem significativamente perceptíveis e induzirem alterações clínicas esperadas (FERNANDES, 2017).

Contudo, apesar de ser considerada o marco no tratamento e modulação clínica da AF, sabe-se que o uso da HU está implicado em respostas terapêuticas individuais e diferenciadas, bem como com possíveis efeitos adversos, o que nos faz pensar em uma cuidadosa e constante avaliação da relação riscos-benefícios de sua administração (TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018; TORRES; CONRAN, 2019; SMITH *et al.*, 2018).

Conforme Cançado *et al.* (2009), toda e qualquer ação indesejada deve ser valorizada, e dentre os possíveis efeitos adversos relacionados à administração da HU, citam-se:

- Neurológicos: letargia, cefaleia, tonturas, desorientação e alucinações (raras).
- Gastrointestinais: estomatite, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e constipação.
- Dermatológicos: erupção maculopapular, eritema facial e periférico, alopecia, pele seca, hiperpigmentação da pele e unhas, ulceração da pele ou agravamento de úlcera já existente.
- Renais: elevação dos níveis séricos de uréia e creatinina.
- Hepáticos: elevação das aminotransferases.
- Reprodutivos: oligospermia, azoospermia.
- Mielotoxicidade.
- Efeito teratogênico (confirmado apenas em animais).
- Hiperesplenismo (em crianças).
- Outros: edema, febre, calafrios, mal-estar, astenia.

Uma das maiores desvantagens subjacentes ao uso da HU é sua toxicidade em vários casos, sobretudo em decorrência de especulações de possíveis efeitos adversos pelo uso prolongado do fármaco, no que tange à atividade citotóxica, teratogênica e carcinogênica (FERNANDES, 2017; NEVITT; JONES; HOWARD, 2017).

Sendo um agente específico que interfere diretamente no ciclo celular, permanece conflitante e controversa a questão de sua eficácia e segurança, em longo prazo, com alguns estudos atribuindo danos ao DNA em indivíduos expostos, enquanto outros relatam baixa mutagenicidade *in vivo*, com frequência de alterações cromossômicas semelhantes às encontradas em indivíduos saudáveis (FRIEDRISCH *et al.*, 2008; JUUL *et al.*, 2010; LANZKRON *et al.*, 2008; PEDROSA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2011). Uma recente revisão da COCHRANE (centro de revisões sistemáticas de ensaios clínicos randomizados) concluiu

que há, atualmente, evidências insuficientes dos benefícios a longo prazo da HU, no que diz respeito à prevenção de complicações crônicas da doença (NEVITT; JONES; HOWARD, 2017; TORRES; CONRAN, 2019).

Todavia, apesar dos prováveis efeitos adversos já referidos, a HU é considerada um medicamento seguro, de fácil controle, cujos efeitos adversos e mielossupressores são facilmente detectáveis e reversíveis com a suspensão de seu uso. Sendo assim, vários pesquisadores têm se manifestado a favor do uso deste medicamento, salientando que os riscos relacionados às complicações secundárias da AF são muito mais elevados e graves que os riscos relacionados aos efeitos adversos da HU (CANÇADO *et al.*, 2009; LANZKRON *et al.*, 2008; LUZZATTO; MAKANI, 2019; TSHILOLO *et al.*, 2019).

2.5.1.2 Transfusão sanguínea

Sabe-se que a AF está associada a uma série de complicações clínicas, desde episódios frequentes de CVO agudas até sequestro esplênico e AVC, para cujas severidades, transfusões de componentes sanguíneos são, muitas vezes, salva-vidas e, portanto, tornam-se a base do tratamento e principal conduta da DF, com mais de 90% dos adultos recebendo pelo menos 01 (uma) transfusão sanguínea em suas vidas (FERNANDES, 2017; WARE *et al.*, 2017).

As transfusões de eritrócitos podem ser administradas por transfusão simples ou de troca. A transfusão de troca é preferencialmente realizada por eritrocitofereze automatizada, mas também pode ser realizada manualmente, enquanto que, as transfusões simples são administradas em unidades (1-3 unidades para adultos) ou em volume (10-20 mL/kg para crianças) (CHOU; FASANO, 2016). A decisão de usar transfusão simples ou de troca depende de necessidades clínicas específicas e da disponibilidade de recursos, incluindo equipamentos de aférese e suporte técnico capacitado, suprimento adequado de unidades doadoras antígeno-negativas e um acesso venoso central apropriado (CHOU; FASANO, 2016).

Transfusões de troca têm sido um método tradicional de terapia da doença desde algumas décadas, especialmente para os casos que incluem os perigos da hipoxemia ou acidose (BUCKLE; PRICE; WHITMORE, 1969), para os quais a transfusão de troca parcial pode ser recomendada tanto para pacientes adultos, crianças e grávidas (FERNANDES, 2017).

Transfusões sanguíneas são dadas agudamente, pela técnica de transfusão simples, para benefícios imediatos, melhorar a capacidade de transporte de O₂ e do fluxo microvascular, reduzindo, assim, o número de eritrócitos falcizados circulantes, crise anêmica grave, lesões

agudas endoteliais, danos inflamatórios em órgãos e como profilaxia pré-operatória (KATO *et al.*, 2018; WARE *et al.*, 2017).

Já a terapia transfusional crônica pode ser usada para prevenir ou tratar complicações clínicas associadas à AF, pela substituição de eritrócitos falcizados rígidos por células deformáveis normais, usando transfusões mensais simples ou de troca (CHOU; FASANO, 2016; TORRES; CONRAN, 2019; WARE *et al.*, 2017). Infartos cerebrais recorrentes, AVC, CVO dolorosas, STA, sequestro esplênico, hiper-hemólise, aplasia transitória das células sanguíneas, hipertensão pulmonar, dentre outros, são exemplos de indicações preventivas ou de conduta de tratamento com transfusões sanguíneas para adultos e crianças com AF (CHOU; FASANO, 2016; FERNANDES, 2017; KATO *et al.*, 2018).

Apesar de seus benefícios comprovados, as transfusões apresentam complicações que podem restringir o seu uso devido à riscos a curto ou a longo prazos e em virtude de vários efeitos adversos potenciais, que incluem: sobrecarga de ferro, hemossiderose, aloimunização (resposta imune a antígenos estranhos que estão presentes no sangue do doador), reações transfusionais hemolíticas, síndrome de hiperviscosidade, complicações hemorrágicas, tromboembolismo, cirrose e risco de infecções virais (FERNANDES, 2017; KATO *et al.*, 2018; TORRES; CONRAN, 2019; WARE *et al.*, 2017).

2.5.1.3 Transplante de células-tronco hematopoiéticas

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) é atualmente a única terapia curativa disponível para a AF (FERNANDES, 2017; TORRES; CONRAN, 2019), sendo estimado que cerca de 2.000 (dois mil) indivíduos com AF já tenham sido submetidos ao transplante alogênico de células-tronco, com taxa de sobrevida superior a 90% (GLUCKMAN *et al.*, 2017; KATO *et al.*, 2018; WALTERS *et al.*, 2016). No entanto, a acessibilidade ao TCTH é limitada a apenas uma pequena proporção de pacientes, devido, principalmente, à: (1) dificuldade de doador familiar com antígeno leucocitário humano (HLA- *human leukocyte antigen*) compatível; (2) toxicidades associadas ao condicionamento mieloablativo; (3) vasculopatia inflamatória; (4) alto custo; (5) complicações generalizadas e (6) falta de disponibilidade física e técnica em hemocentros (ANSARI; GAVINS, 2019; MATTE *et al.*, 2019).

O primeiro caso de sucesso de transplante de medula óssea (TMO) foi relatado, em 1984, em uma criança com AF que havia desenvolvido leucemia mielóide aguda (JOHNSON *et al.*, 1984). Apesar de uma série de resultados subsequentes bem sucedidos, altas taxas de

mortalidade em pacientes com mais de 16 anos de idade e a dificuldade em obter doadores HLA compatíveis limitaram o potencial do TMO (FERNANDES, 2017), o qual, nos últimos tempos, vem recuperando o foco terapêutico graças aos regimes de condicionamentos melhorados (menos tóxicos), às variantes de transplante de células tronco como o transplante de sangue do cordão umbilical, às possíveis associações com as terapias genéticas, bem como ao surgimento de registros globais para detectar a disponibilidade de doadores compatíveis mais facilmente (FERNANDES, 2017; PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

Os primeiros resultados com regimes experimentais de condicionamento de intensidade reduzida (quimioterapia pré-transplante para remover ou suprimir a medula óssea do receptor, criando espaço para o enxerto de doadores e a hematopoiese) têm sido muito encorajadores (SARAF *et al.*, 2016), induzindo um estado de quimerismo entre as células do paciente e do doador e baixa taxa de mortalidade ou de doença do enxerto (FERNANDES, 2017; SARAF *et al.*, 2016).

Alguns estudos inovadores vêm sendo realizados com transplantes envolvendo doadores haploidênticos (que compartilham 50% dos antígenos HLA com o receptor), e podem permitir que um maior número de pacientes com AF se qualifiquem para o TMO, porém a taxa de rejeição do enxerto ainda é considerável e alguns pacientes apresentaram reversão para a doença com o passar do tempo (FERNANDES, 2017; SARAF *et al.*, 2016).

2.5.2 Novas abordagens de tratamento e perspectivas de conduta

A fisiopatologia da AF envolve variados processos, interligados e interdependentes, que afetam não somente os eritrócitos, mas todas as células sanguíneas, a vasculatura, endotélio, os tecidos e órgãos adjacentes e múltiplas vias biológicas.

A oclusão vascular e a hemólise estão inter-relacionadas, amplificando-se mutuamente e promovendo a produção de uma miríade de mediadores biológicos, os quais sofrem interações adesivas e estímulos mútuos que, por sua vez, induzem a uma lentidão do trânsito microvascular e a uma condição de hipóxia local. Estes eventos, adicionados à baixa deformabilidade dos eritrócitos falciformes, instigam o aumento da desoxigenação intracelular, a polimerização, falcização, a adesão celular e novos episódios de vaso-oclusão (EATON; BUNN, 2017).

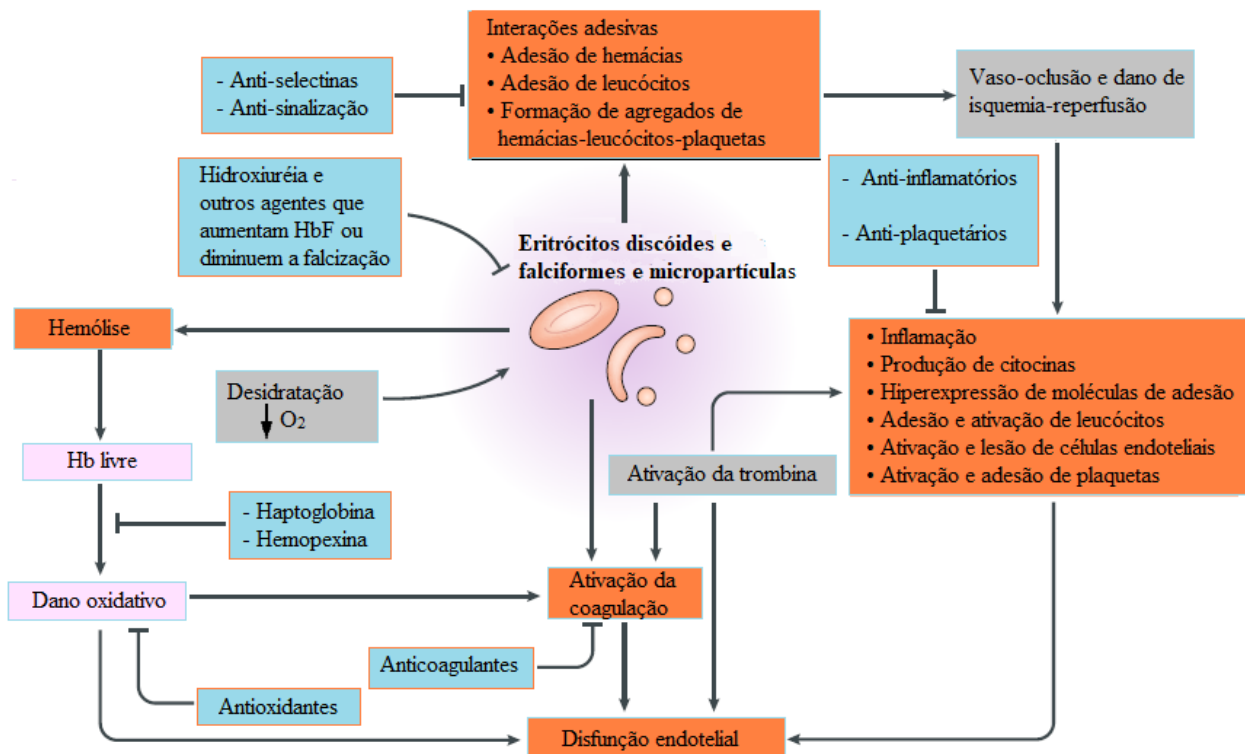
Os danos de isquemia-reperfusão, provavelmente, ocorrem em todos os órgãos de pacientes com AF (TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018) e são alimentados continuamente por estímulos pró-inflamatórios e pró-oxidantes, resultantes de interações entre os diversos tipos de células. Alterações na hematopoiese, ativação da cascata de coagulação, liberação de

citocinas e substâncias oxidantes, aumento da expressão de moléculas de adesão, redução da biodisponibilidade do NO e a ativação e disfunção endotelial se propagam e acabam estimulando novos eventos, que culminam em lesões e falência de diversos órgãos e sistemas (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; PICCIN *et al.*, 2019; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Dada a complexidade fisiopatológica, múltiplas abordagens terapêuticas têm sido investigadas visando diferentes aspectos dos mecanismos desencadeantes do quadro clínico da doença, dentre os quais, destacam-se: agentes que induzam a Hb F, agentes antifalcização, agentes anti-inflamatórios, antiestresse oxidativo, moduladores de danos de isquemia-reperfusão, terapias antitrombóticas e terapias antiplaquetárias (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; MATTE *et al.*, 2019; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018).

A figura 14 ilustra as principais vias fisiopatológicas da AF e as oportunidades para as terapias alvo.

Figura 14 - Vias da fisiopatologia da anemia falciforme e oportunidades para a terapia direcionada



Fonte: Adaptado de Telen; Malik e Vercellotti (2018).

2.5.2.1 Terapia genética

Terapias genéticas (ou terapias gênicas), incluindo abordagens de edição genômica, representam promissoras alternativas terapêuticas para a AF, onde o TCTH, autólogo e manipulado, para pacientes sem doador de medula óssea compatível, poderia potencialmente ser usado para elevar a produção de Hb F, inibir a polimerização de Hb S ou transferir um gene de β -globina substituído ou geneticamente corrigido para o paciente (LIU *et al.*, 2002; RIBEIL *et al.*, 2017; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018).

A nova abordagem da terapia genética utiliza a medula óssea para isolar células-tronco com posterior incubação, *ex vivo*, com vetores de lentivírus contendo um gene específico adicional. Após o tratamento com quimioterapia mieloablativa, o paciente recebe re-infusão das células-tronco autólogas modificadas que, então, repovoam a medula e expressam o novo gene. As abordagens atuais adicionam genes que codificam β -globinas antifalciformes (por exemplo, AT87Q, AS3) ou que codificam a Hb F, projetados para produção apenas em progenitores eritróides (CANVER; ORKIN, 2016; CAVAZZANA *et al.*, 2015).

Além da adição de genes, abordagens envolvendo correção gênica para indução de Hb F estão em estágios pré-clínicos de investigação, bem como as que visam o silenciamento ou supressão do BCL11A, um fator transcricional que inibe potentemente a expressão de globina. Técnicas de edição, ou correção, de genoma como o *looping* de cromatina forçado (para reverter a troca de globina) e o desenvolvimento de técnicas CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), que permitem a substituição precisa de uma região específica do DNA, também estão em andamento e poderão ser executadas no futuro (POLI; ORANGE, 2017; RIBEIL *et al.*, 2017).

Diferentes estudos clínicos sobre terapia genética em AF estão em andamento em vários países, desde meados da década de 90 (KATO *et al.*, 2018), e trarão um forte impacto positivo como uma nova ferramenta terapêutica potencial para correção, ou cura, de um defeito na molécula de Hb (LIU *et al.*, 2002; RIBEIL *et al.*, 2017). No entanto, tendo em vista os desafios técnicos, econômicos e éticos, parece muito improvável que essas novas terapias sejam amplamente utilizadas em curto prazo (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). A longo prazo, é provável que os altos custos permaneçam como uma barreira importante à sua disponibilidade, particularmente entre os pacientes e regiões menos favorecidos economicamente.

2.5.2.2 Terapia de micronutrientes e a L-Glutamina

A descoberta da terapia com micronutrientes abriu, de fato, novas linhas no empreendimento terapêutico para a AF, uma vez que, em razão da abrangente fisiopatologia da doença, diversos estudos multidisciplinares têm sido iniciados em todas as partes do mundo, com o objetivo de entender os efeitos dos micronutrientes, ou a falta desses, sobre os sintomas e gravidade da doença (DEKKER *et al.*, 2012; FERNANDES, 2017).

Em um estudo focado na abordagem nutricional, Dekker *et al.* (2012) atestaram haver uma associação entre determinadas características da AF, tais como: baixa estatura dos pacientes, alta suscetibilidade às infecções, episódios recorrentes de dor e danos irreversíveis a órgãos, com o estado nutricional dos pacientes, demonstrando que a deficiência em micronutrientes aumenta a suscetibilidade a esses eventos e que uma suplementação adequada de aminoácidos e outras substâncias é capaz de reduzir os efeitos dessas complicações.

Os pacientes com AF podem sofrer de um suprimento nutricional limitado devido a uma diminuição na ingestão, assimilação e/ou absorção de nutrientes, à danos na mucosa intestinal ou em decorrência de uma circulação hiper-dinâmica e alteração do metabolismo, assim como, pelo aumento na taxa da excreção renal e da demanda por folatos e outras vitaminas resultante da rápida destruição dos eritrócitos (DEKKER *et al.*, 2012; MANDESE *et al.*, 2015).

Evidências sugerem que alguns micronutrientes, como: ácidos graxos (ex.: ômega-3), minerais (ex.: folatos, magnésio e zinco), vitaminas (ex.: B₆, B₁₂, C, D e E), aminoácidos e ácido fólico, encontram-se em concentrações inadequadas em pacientes falciformes, sendo, dessa forma, a terapia de micronutrientes, um alvo de grande interesse para pesquisas e manejo de conduta, com a finalidade de melhorar o bem-estar do paciente e reduzir a ocorrência de episódios dolorosos (DEKKER *et al.*, 2012; FERNANDES, 2017; MANDESE *et al.*, 2015).

A suplementação de zinco, por exemplo, está associada a um aumento significativo na estatura média de crianças que fizeram uso por um período de 01 (um) ano, quando comparado a outro grupo de crianças sem a suplementação (ZEMEL *et al.*, 2007). Em estudos com pacientes adultos, foi observada uma associação da suplementação de zinco com a redução de ocorrências de infecções, inclusive as respiratórias, e eventos inflamatórios (BAO *et al.*, 2008).

Recentemente, no ano de 2017, a L-glutamina foi aprovada pelo FDA para uso em DF, sendo-lhe atestado a capacidade de reduzir complicações agudas da AF, tanto em pacientes adultos como em crianças, a partir de 5 anos de idade, (recomendado dose de 5-15 g por via oral, duas vezes ao dia) (ANSARI; GAVINS, 2019; TORRES; CONRAN, 2019).

A L-glutamina é um aminoácido envolvido no transporte de nitrogênio, na regulação da homeostase ácido-base e na sinalização catabólica, além de ser um substrato gliconeogênico, em certos tecidos, e necessário à síntese de outros aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e hexosaminas (MORRIS *et al.*, 2017; QUINN, 2018). De particular interesse para o tratamento de pacientes com AF, a glutamina é um precursor para a síntese de arginina, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e glutathiona, substâncias estas que protegem os eritrócitos do dano oxidativo e mantêm o tônus vascular (PICCIN *et al.*, 2019; QUINN, 2018).

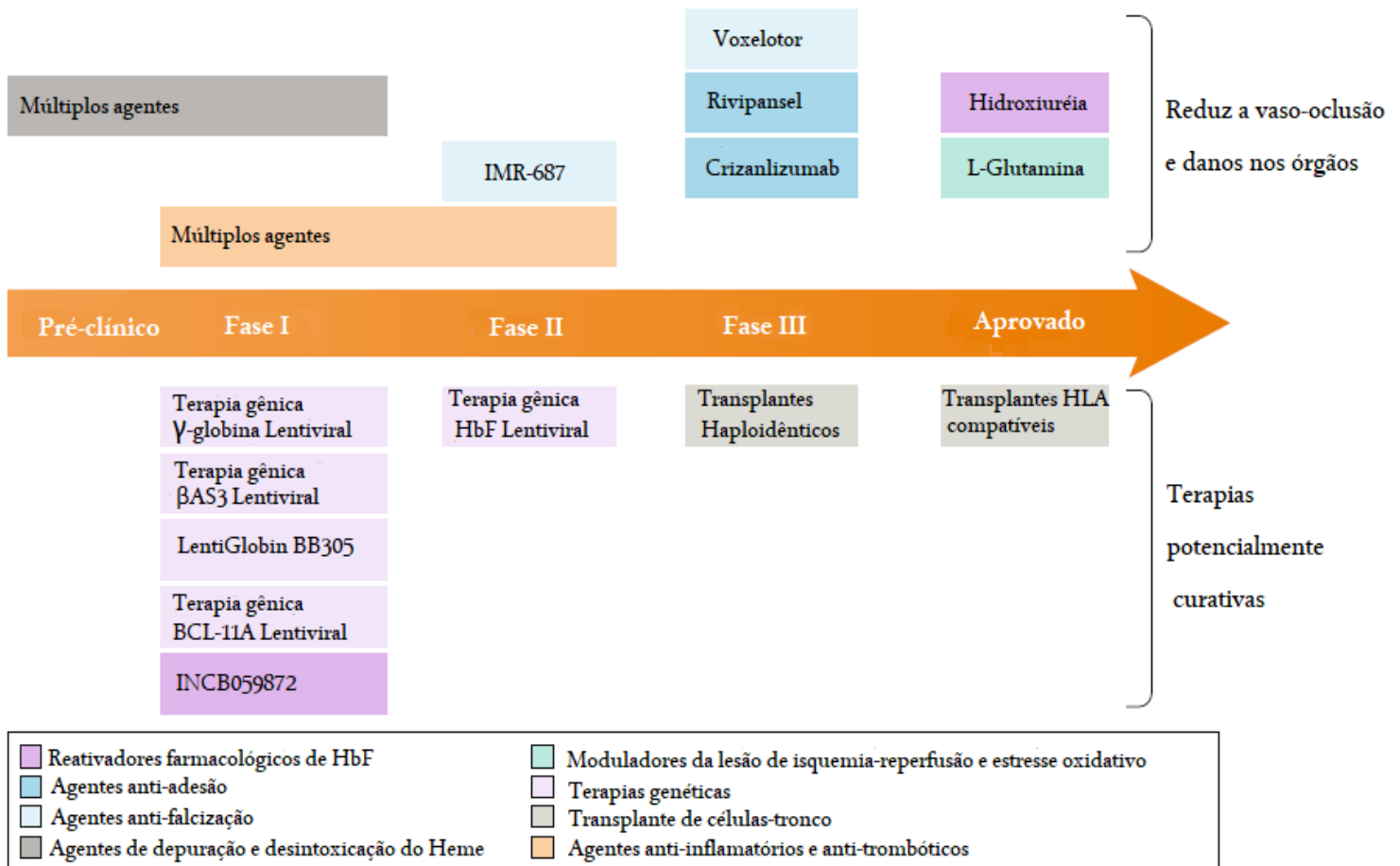
A L-glutamina age como um importante antioxidante, melhorando o potencial redox da NAD dos eritrócitos (sabidamente reduzido na AF), e tem a propriedade de reduzir a adesão de eritrócitos falciformes às células endoteliais e a frequência de CVO (MORRIS *et al.*, 2017; NIIHARA *et al.*, 2005). Adicionalmente a isso, recentemente foi demonstrado que, durante a eritropoiese tardia, a glutamina endógena pode contribuir com a biossíntese do heme, por fornecer carbonos para a succinil-CoA (BURCH *et al.*, 2018), e seu uso está associado à diminuição no número de hospitalizações por dores falciformes e incidência de STA, independentemente do uso de HU (NIIHARA *et al.*, 2018).

Todavia, em nenhum estudo realizado houve melhorias significativas nos níveis de Hb, hematócrito ou contagem de reticulócitos, e o uso desta substância em indivíduos com insuficiência hepática ou renal deve ser feito com atenta monitoração, uma vez que tais pacientes não foram incluídos no estudo de fase III. Ademais, muitos dos resultados dos estudos clínicos ainda não foram oficialmente publicados (NIIHARA *et al.*, 2018).

2.5.2.3 Abordagens farmacoterapêuticas baseadas na fisiopatologia da doença

Um considerável número de novas modalidades terapêuticas preventivas, bem como ensaios de compostos existentes, que visam um ou mais dos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da doença, estão atualmente em estudos de fase II ou fase III (FIGURA 15), com esmera diligência em melhorar o prognóstico geral da AF, bem como reduzir ou tratar sua manifestação cardeal, a vaso-oclusão (TELEN, 2016).

Figura 15 – Abordagens terapêuticas para a anemia falciforme, baseadas em sua fisiopatologia



Fonte: Adaptado de Telen; Malik e Vercellotti (2018).

A figura indica estratégias terapêuticas promissoras e terapias específicas (candidatas) que estão sendo ativamente pesquisadas, bem como as duas terapias farmacológicas já aprovadas (hidroxiuréia e l-glutamina). Os agentes que visam melhorar as várias consequências da falcização dos eritrócitos são mostrados na metade superior da figura, e os agentes e abordagens que potencialmente curam a doença falciforme são mostrados na metade inferior da figura. HbF: hemoglobina fetal; HLA: antígeno leucocitário humano.

Até o momento, três dos principais candidatos a fármacos para tratamento da AF estão em fase final de desenvolvimento - Crizanlizumab, Rivipansel e Voxelotor – e têm mostrado efeitos positivos, tanto na presença como na ausência de HU (TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018). O crizanlizumab, por exemplo, é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à P-selectina na superfície das células endoteliais e plaquetas, bloqueando a interação célula-célula (ATAGA *et al.*, 2017). De igual ação antiadesão, o rivipansel está sendo testado como inibidor de pan-selectina para se prevenir e reduzir a duração de episódios de vaso-oclusão e dores falciformes (KATO *et al.*, 2018; WARE *et al.*, 2017).

Dada a diversidade de alvos terapêuticos e farmacocinética de fármacos potenciais, ensaios de novas terapias, voltadas ao tratamento de pacientes com AF, têm se concentrado em uma variedade de diferentes resultados que podem desenvolver abordagens combinacionais

eficazes para gerir complicações agudas dolorosas, prevenir eventos falciformes (tais como: CVO, STA e AVC) e tratar ou encurtar intercorrências clínicas em curso (ANSARI; GAVINS, 2019; KATO *et al.*, 2018; TELEN, 2016).

A curto prazo, a identificação de formas de melhorar o uso de terapias comprovadas, como a HU e o TCTH, é o caminho mais rápido para melhorar o manejo da doença. No entanto, permanecem questões importantes ainda a serem elucidadas sobre a eficácia a longo prazo da HU, formas de melhorar a adesão à terapia, a não responsividade à terapia por parte de muitos pacientes e o possível desenvolvimento de resistência à antibacterianos em alguns pacientes com AF. Devido à complexidade da doença e ao leque de possíveis complicações, uma abordagem de múltiplas drogas provavelmente será usada, muito em breve, com maior convicção por profissionais de saúde (KATO *et al.*, 2018; TELEN, 2016). Contudo, o desenvolvimento de medicamentos seguros é um processo demorado; assim, as intervenções com múltiplas drogas, provavelmente, estarão disponíveis apenas a médio ou longo prazo, e uma abordagem mais criteriosa e personalizada será de grande magnitude para maximizar o tratamento e qualidade de vida do indivíduo com AF.

As tabelas 2, 3 e 4 resumem algumas das abordagens farmacológicas atuais e de ensaios clínicos em aberto (vigentes).

Tabela 2 – Agentes farmacológicos antifalcização, indutores de hemoglobina fetal e anti-inflamatórios

Agentes Terapêuticos	Propriedades
Agentes antifalcização e indutores de Hb F	
Hidroxiuréia	Aumenta expressão da Hb F. Multiclasse
Voxelotor (GBT-440)	Estabiliza a Hb S na conformação oxi-Hb, inibindo polimerização
Decitabina	Aumenta expressão da Hb F. Inibidor da DNA metiltransferase 1
Pomalidomida	Aumenta expressão da Hb F
Pidolato de magnésio	Melhora a hidratação celular
SCD-101 ou NIX-0699 (Niprisan)	Inibidor da polimerização da Hb S. Curva Oxi-Hb. (fitoquímico)
CO (MP ₄ CO e PEG-bHb-CO)	Forma Hb-CO; previne falcização; agente anti-inflamatório
Senicopac	Inibidor do Canal de Gardos. Melhora a hidratação celular
Sanguinate	Melhora os níveis de oxigênio nos tecidos
Ácido hidroxâmico suberoilânilida (vorinostat)	Aumenta expressão da Hb F. Inibidor de HDAC. Antioxidante
Metformina	Indução de FOXO3, porém mecanismo de indução de Hb F em células eritróides humanas é desconhecido
Derivados de vanilina	Diminui a polimerização da Hb S, aumentando a afinidade da HbS pelo oxigênio
Agentes anti-inflamatórios	
Regadenoson	Agonista seletivo dos receptores de adenosina A2A. Modula células Natural Killer T invariáveis
Ômega 3	Mantém a bicamada lipídica e a composição fosfolipídica da membrana. Protege contra vasculopatias
Estatinas	Up-regulação de eNOS, reduz mediadores inflamatórios e expressão de moléculas de adesão
Propranolol	Bloqueia a adrenalina e a vaso-oclusão induzida por TNF e molécula de adesão de células basais
Poloxamer 188	Melhora a reologia vascular. Múltiplos mecanismos. Agente antiadesão
Etanercept	Bloqueia TNF
Sulfasalazina	Inibição de NF-κB
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	Atividade vasodilatadora multimodal, anti-inflamatória e analgésica
Inibidores de leucotrieno	Bloqueia leucotrienos
Cúrcuma (açafrão)	Diminui citocinas inflamatórias; aumenta antioxidantes

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

CO, monóxido de carbono; Hb, hemoglobina; Hb F, hemoglobina F; Hb S, hemoglobina S; HDAC, histona desacetilase; MP₄CO, carboxi-hemoglobina peguilada; PEG-bHb-CO, carboxi-hemoglobina bovina peguilada; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; UFC, fator de necrose tumoral; NF-κB, fator nuclear kappa beta.

Ref.: (ANSARI; GAVINS, 2019; MATTE *et al.*, 2019; TELEN, 2016; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018; WARE *et al.*, 2017).

Tabela 3 – Agentes farmacológicos antiadesão, antioxidantes e moduladores de danos de isquemia-reperusão

Agentes Terapêuticos	Propriedades
<i>Agentes antiadesão</i>	
Rivipansel	Inibidor da pan-selectina com atividade mais forte contra a E-selectina
Crizanlizumab	Inibidor da P-selectina
Sevuparin	Heparinoide que bloqueia a P-selectina, L-selectina, trombospondina, fator de von Willebrand e fibronectina
Heparinas não sulfatadas	Bloqueia P-selectina e possivelmente outros ligantes adesivos
Beta-bloqueadores	Previne ativação dos receptores de adesão de eritrócitos ICAM4, Lu / BCAM e CD44
<i>Agentes antioxidantes e moduladores de danos de isquemia-reperusão</i>	
L-Glutamina	Aumenta os níveis de NADH
Alopurinol	Inibe a xantina oxidase
Óxido nítrico (inalação)	Homeostase do óxido nítrico. Vasodilatador; antioxidante; antiadesão; antitrombótico
Sildenafil	Inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5); eleva o cGMP
L-arginina	Substrato do óxido nítrico
N-acetilcisteína	Eleva sulfidrilas; antioxidante
Riociguat	Ativa guanilil ciclase solúvel
Trimidox e quelantes de ferro	Depura o excesso de ferro. Quelante de ferro

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

ICAM, molécula de adesão intercelular; Lu / BCAM, molécula de adesão basocelular luterana; NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo; cGMP, guanosina monofosfato cíclico.

Ref.: (ANSARI; GAVINS, 2019; ATAGA *et al.*, 2017; MATTE *et al.*, 2019; NIIHARA *et al.*, 2018; TELEN, 2016; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018; WARE *et al.*, 2017).

Tabela 4 – Agentes farmacológicos antiplaquetários, anticoagulantes e órgãos-específicos

Agentes Terapêuticos	Propriedades
Agentes antiplaquetários	
Prasugrel	Reduz ativação e agregação plaquetária via ADP Antagonista do receptor P2Y ₁₂ ADP
Aspirina	AINE; Inibidor da prostaglandina sintase e agregação plaquetária
Piroxicam	AINE; inibe a síntese de prostaglandinas e agregação plaquetária
Eptifibatide	Ação antiplaquetária via GPIIb / IIIa
Agentes anticoagulantes	
Varfarina, dicumarol e acenocumarol	Antagonistas da vit K; inibem a produção de fatores pró-coagulantes II, VII, IX e X, e anticoagulantes (proteínas C e S)
Heparina	Antitrombina
Rivaroxabana e apixabana	Inibidores do fator Xa
Dabigatran e Dalteparin	Inibidores da trombina
Agentes órgãos-específicos	
Losartan	Inibe o receptor de angiotensina; reduz albuminúria
Inibidores da ECA (como lisinopril, enalapril e captopril)	Reduz a albuminúria e retarda a progressão de outras nefropatias
Bosentan	Antagonista do receptor de endotelina
Varespladibe	Inibe a fosfolipase A2 secretora

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

ADP, adenosina difosfato; AINE, anti-inflamatório não esteroidal; GP, glicoproteína plaquetária.

Ref.: (ANSARI; GAVINS, 2019; MATTE *et al.*, 2019; TELEN, 2016; TELEN; MALIK; VERCELLOTTI, 2018; WARE *et al.*, 2017).

3 RELEVÂNCIA

Sabe-se que a AF é uma doença hemolítica crônica e hereditária, caracterizada por eventos que envolvem vaso-oclusões recorrentes e severos danos de isquemia-reperfusão, cujas principais manifestações clínicas são anemia, dor e falência de múltiplos órgãos, com considerável espectro de gravidade e morbimortalidade (LOPES *et al.*, 2014).

Sendo a hipóxia o gatilho primordial para a falcização da Hb, é também a responsável pelo desencadeamento das manifestações clínicas da AF, das quais muitos aspectos fisiopatológicos e moleculares permanecem não compreendidos e com elevada heterogeneidade entre os pacientes (BALLAS, 2018; KATO *et al.*, 2018). Ao mesmo tempo, é reputado à hipóxia a condição de agente transformador da fisiologia celular de distintas e numerosas maneiras, e de várias patologias, capaz de promover profundas mudanças no metabolismo, crescimento e sobrevivência celular, na susceptibilidade à apoptose, na indução da angiogênese, instabilidade genética e no desenvolvimento de mutagenicidade e neoplasias (GLAZER *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2016).

Um estado pró-angiogênico e de tônus antiapoptótico para células endoteliais, anormalmente aumentado, podem estar associados à AF e esta condição pode estar envolvida em vários aspectos clínicos da doença, incluindo, em particular, a incidência de retinopatia proliferativa, remodelamento irreversível da vasculatura, danos oxidativos, hipertensão pulmonar, úlceras nas pernas, condições inflamatórias crônicas e Síndrome de Moyamoya. Além disso, numerosos mediadores angiogênicos foram relatados como elevados nos pacientes, apoiando a hipótese de existência de um desequilíbrio angiogênico nessa doença, em virtude de concentrações elevadas de VEGF, em resposta à transcrição do gene *HIF-1 α* e estímulos hipóxicos (ANSARI; GAVINS, 2019; LOPES *et al.*, 2014).

Implicações recentes têm sugerido que os mecanismos de detecção e reparo de dano no DNA podem estar reprimidos em pacientes com AF, e níveis alterados das quinases ATM e ATR têm sido indicados como possíveis biomarcadores. Adicionalmente, evidências emergentes têm demonstrado associações positivas entre a doença e aberrações cromossômicas, ou mesmo com certos tipos de neoplasias, como o carcinoma medular renal, cuja mortalidade em pacientes falciformes aproxima-se de 100%, poucos meses após o diagnóstico (ALVES *et al.*, 2008; GATALICA *et al.*, 2011; SWARTZ *et al.*, 2002). Brunson *et al.* (2017) descrevem que pacientes com DF apresentam um risco 72% maior de serem acometidos por malignidades hematológicas, e um risco duas vezes maior para adquirir algum subtipo de leucemia,

destacando a leucemia mielóide aguda e leucemia linfocítica crônica, em relação à indivíduos saudáveis.

Sendo assim, faz-se de extrema pertinência e relevância uma investigação a respeito da AF no contexto da hipóxia, visto que esta é uma característica constante e motriz na patogênese da doença. Apesar de ser grande instigadora e promotora da expressão de muitos genes alvos envolvidos em imensuráveis mecanismos fisiológicos de grande importância para a sobrevivência do homem, pouco ainda se sabe sobre seu papel na fisiopatologia da AF (TAN *et al.*, 2016).

Vale salientar que os efeitos benéficos da HU, medicamento padrão no tratamento de pacientes com AF, devem-se à sua capacidade de inibir a replicação do DNA para elevar os níveis da Hb F e melhorar e/ou impedir o desenvolvimento de eventos clínicos na doença (ANSARI; GAVINS, 2019; KATO *et al.*, 2018). Porém, além do fato de nem todos os pacientes responderem bem ao seu tratamento, ou deixarem de responder benéficamente mesmo após anos de uso com bons resultados, evidências sugerem que a HU apresenta um potencial efeito antiangiogênico e de dano à estrutura do DNA (LOPES *et al.*, 2014; WU; MIYAMOTO, 2008), e não temos encontrado na literatura, até o presente momento, estudos que relacionem a ação da HU e a ingerência da hipóxia na patologia da AF.

Isto posto, no presente estudo, propomos investigar a expressão de genes de resposta à sinalização de hipóxia na AF e analisar a influência da farmacoterapia com HU em marcadores de angiogênese e danos ao DNA.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Investigar a expressão de genes de dano e reparo de DNA e angiogênese induzidos pela hipóxia em pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxiuréia.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar, de maneira associada, o perfil demográfico e laboratorial de pacientes com anemia falciforme, tratados ou não com HU;
- Mensurar a expressão dos genes responsivos à hipóxia (*HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*), correlacionando-os entre si, com a expressão dos genes em indivíduos saudáveis (grupo controle), e com variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes em estudo;
- Caracterizar os pacientes do estudo de acordo com o fenótipo (gravidade) clínico da doença (leve, intermediária ou grave), analisada por meio da “Calculadora de gravidade da doença falciforme”, avaliando a influência da expressão gênica sobre o perfil fenotípico encontrado;
- Descrever a frequência de intercorrências clínicas (hospitalização, transfusão sanguínea, crises dolorosas, comorbidades, etc.) e estimar sua associação com a expressão de genes hipóxicos (*HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*) em pacientes com anemia falciforme;
- Avaliar a resposta do paciente ao tratamento com HU, através da mensuração de marcadores bioquímicos e laboratoriais, descrição do fenótipo da doença falciforme e expressão gênica;
- Investigar a correlação entre a expressão dos genes responsivos à hipóxia (*HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*) com as doses de HU administrada aos pacientes com AF;

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará/Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), e aprovado sob parecer de nº 2.781.191, segundo os princípios e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 e complementares. Tal parecer diz respeito à versão atualizada e final do projeto de pesquisa aprovado pelo CEP/HUWC (nº 706.154).

Obs.1: O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado por todos os participantes deste estudo também foi aprovado pelo comitê supracitado (APÊNDICE A).

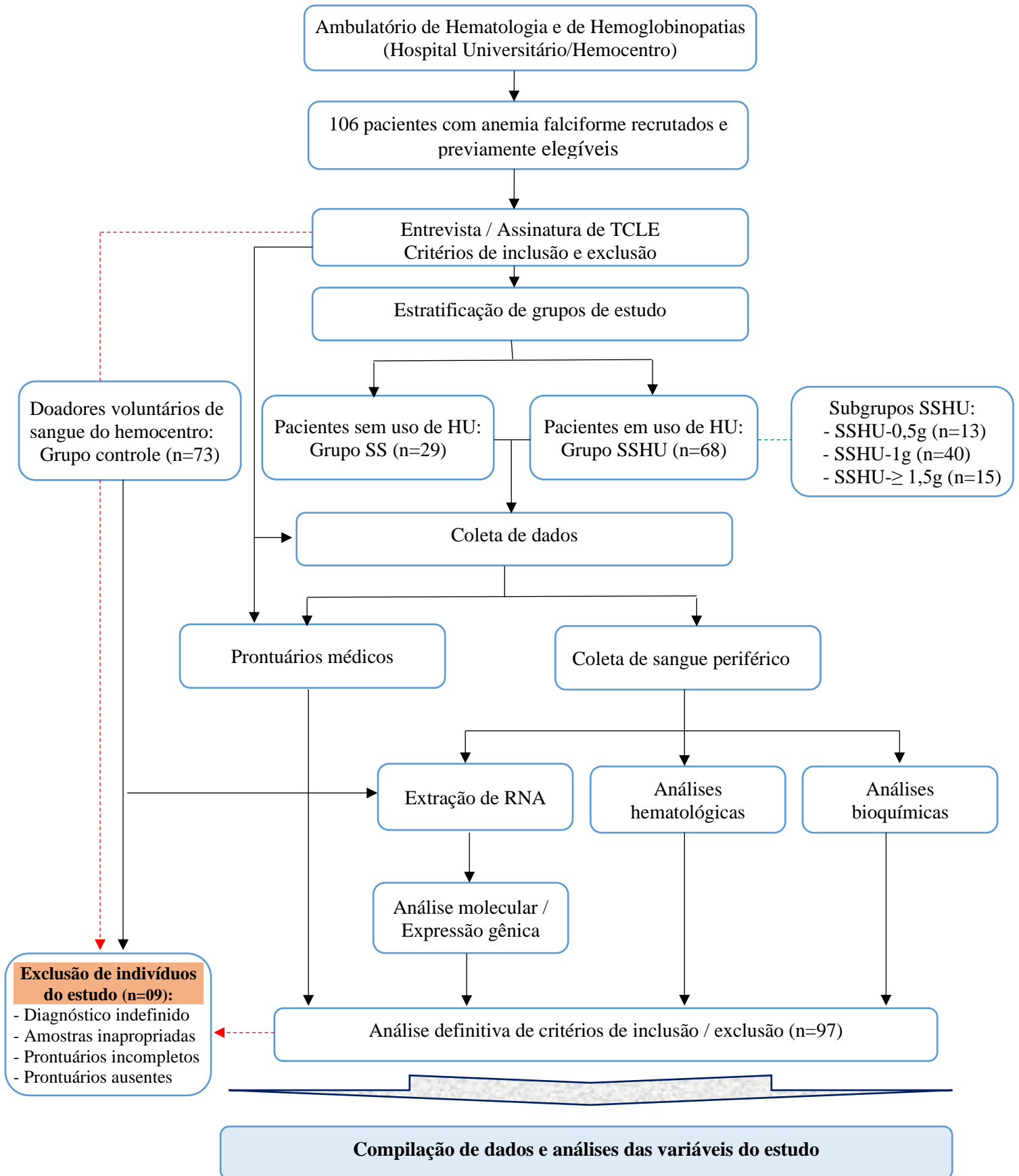
Obs.2: Todos os experimentos foram realizados seguindo as normas de Biossegurança de acordo com a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005.

5.2 Delineamento do estudo

Esta pesquisa enquadra-se na tipologia de estudo observacional, transversal e analítico, e se propôs a investigar, de maneira associada, a interposição da hipóxia na modulação da expressão de genes relacionados aos mecanismos de angiogênese e de dano/reparo de DNA em pacientes com AF, associando a expressão gênica mensurada à variáveis clínico-laboratoriais. Também está incluso no delineamento desta pesquisa, a investigação da influência do tratamento com a hidroxiuréia, em relação dose-efeito, sobre os mesmos parâmetros. Um grupo de indivíduos saudáveis foi utilizado como grupo controle, conforme apropriado.

A Figura 16 apresenta o esquema de fluxograma de delineamento do estudo proposto.

Figura 16- Fluxograma de delineamento de estudo



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

5.3 Local de realização do estudo

O recrutamento e coleta das amostras de sangue periférico dos pacientes que concordaram em participar do estudo foram realizados no ambulatório de hematologia de um hospital universitário e de um hemocentro público, ambos de referência no Estado do Ceará-Brasil e sediados na cidade de Fortaleza-CE. As amostras de sangue periférico dos voluntários saudáveis foram obtidas no setor de doação de sangue do mesmo hemocentro supracitado.

O processamento e as análises do material biológico foram executados com a colaboração do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) e do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), ambos pertencentes ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.4 Seleção da amostra

5.4.1 População do estudo

O número amostral proposto para a realização deste estudo, aproximadamente 140 pacientes, foi pensado para ser a totalidade de portadores de AF com cadastros ativos, atendidos pelos ambulatórios do setor de hematologia do hospital universitário e do hemocentro participantes da pesquisa. Deste universo, foram incluídos no estudo apenas os pacientes que consentiram, voluntariamente, em participar da pesquisa, que leram e assinaram o TCLE, cujas amostras possuíam qualidade suficiente para a realização fidedigna dos experimentos pretendidos e que atenderam aos critérios de inclusão descritos na seção terciária **5.4.4** deste trabalho. Todos os pacientes se encontravam em acompanhamento clínico e em conformidade com os Protocolos e Diretrizes Terapêuticas para pessoas com Doença Falciforme estabelecido pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2018) e faziam uso profilático de ácido fólico (5mg/dia) desde o diagnóstico inicial da doença.

5.4.2 Representatividade e cálculo do tamanho amostral

Da população total de pacientes com AF, atendidos pela equipe médica das instituições colaboradoras desta pesquisa, 106 (75,71%) indivíduos se propuseram a participar, fornecendo informações básicas iniciais para o preenchimento de uma 'Ficha clínica de estudo e

acompanhamento do paciente com anemia falciforme' (APÊNDICE B), a qual serviu para compilar as planilhas de informações e dados de estudo, bem como, se dispuseram a fornecer amostras de sangue total para as análises apropriadas. Após observância dos critérios e condições necessários para o prosseguimento do estudo, dos pacientes que aderiram a esta proposta de pesquisa, obtivemos uma população amostral de 97 (91,50%) pacientes aptos, correspondendo à 69,29% dos prontuários ativos.

5.4.3 Estratificação dos grupos de estudo

Os pacientes falciformes (n=97) foram selecionados de forma aleatória, por conveniência, mediante consulta e acompanhamento médico já agendados, respeitando sexo, idade, esquema terapêutico e quadro clínico dos mesmos. Em seguida, foram estratificados em dois grupos, segundo o uso ou não da hidroxiuréia no tratamento:

- **Grupo SS:** formado por 29 (29,90%) pacientes com anemia falciforme, sem uso de HU.

- **Grupo SSHU:** formado por 68 (70,10%) pacientes com anemia falciforme em tratamento com a HU. Foram considerados pertencentes a este grupo, pacientes que faziam uso do medicamento por período ≥ 180 dias, de forma regular e contínua.

Para algumas análises, o grupo SSHU fora ainda estratificado conforme a posologia administrada do medicamento, para se investigar a relação dose-efeito, em 03 subgrupos: grupo **SSHU-0,5g** (n= 13 (19,11%)); grupo **SSHU-1g** (n= 40 (58,82%)) e grupo **SSHU- $\geq 1,5g$** (n= 15 (22,07%)). A determinação da dose de medicamento em cada subgrupo foi estabelecida baseando-se nas doses habituais tomadas pelos pacientes, rotineiramente, que fazem uso de uma (01) a quatro (04) cápsulas diárias de HU (ou pela média da concentração quando a prescrição médica requer quantidades diferentes de cápsulas em dias alternados), sendo a concentração de substância/cápsula igual à 500 mg (0,5g).

Usualmente, a posologia de HU a ser administrada ao paciente é determinada fazendo-se o cálculo da 'quantidade de medicamento em mg/kg/dia' ou considerando dosagem individualizada e personalizada, baseada na farmacocinética. Na prescrição médica, consta-se o número de cápsulas e regime diário que o paciente deve fazer uso. A fim de facilitar a obtenção e a análise dos dados, optamos por considerar a estratificação dos subgrupos SSHU, nomeando-os como descrito acima (0,5g, 1g e $\geq 1,5g$).

O grupo controle (**Grupo AA**), formado por indivíduos saudáveis, foi composto por 73 voluntários, selecionados de forma aleatória dentre os doadores de sangue do hemocentro

participante, desde que obedecidos os critérios de inclusão, próprios para este grupo, e definidos como a seguir.

5.4.4 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes do estudo

Todos os participantes recrutados para o estudo foram esclarecidos em uma entrevista a respeito dos procedimentos experimentais, objetivos, riscos e benefícios envolvidos na pesquisa, e, após anuência voluntária e altruísta, assinaram o TCLE, resguardando alguns critérios exigidos:

- **PACIENTES:**

Os pacientes (grupos SS e SSHU), de ambos os sexos e independente de etnia, deveriam apresentar AF, diagnosticada por exame de biologia molecular, independente do uso ou não do medicamento hidroxiuréia; deveriam possuir idade igual ou superior a 18 anos e não serem tabagistas, etilistas ou gestantes; deveriam ainda apresentar sorologia negativa para HIV-1 e 2, HBV, HCV ou HTLV-1 e 2 e estarem em estado estacionário da doença, de acordo com os critérios de Ballas (2012): ausência de episódios dolorosos agudos e/ou doenças intercorrentes, como infecções e inflamações, nas quatro semanas precedentes ao estudo; ausência de admissões hospitalares até o terceiro dia após coleta de sangue, bem como, apresentar ausência de transfusão sanguínea nos quatro meses precedentes ao estudo. Para o grupo SSHU, os pacientes deveriam fazer uso de 15-30 mg/kg/dia de HU, variando de 500 mg a 2.000 mg diárias, por um período de pelo menos 180 dias.

Foram tomados como critérios de exclusão a não concordância e assinatura do TCLE, pacientes que não apresentaram análises de hemoglobinas confirmatórias do perfil SS por HPLC, pacientes com prontuários não disponibilizados ou não encontrados até o final do estudo ou cujos prontuários não dispunham de informações consistentes quanto ao seu diagnóstico, tratamento ou acompanhamento clínico. De igual forma, também foram excluídos os pacientes cujas amostras biológicas não apresentaram boa qualidade para a execução dos exames de expressão gênica ou que fizeram uso de AINE, quelantes de ferro, vitaminas antioxidantes ou algum imunossupressor nos 15 (quinze) dias que antecederam à coleta de sangue.

- **GRUPO CONTROLE:**

Neste grupo, foram incluídos indivíduos adultos, doadores de sangue no hemocentro que fez parte do estudo, de ambos os sexos, com idades e características pareadas aos grupos

de pacientes, não fumantes, que não faziam consumo habitual de bebida alcoólica ou fármacos, sem evidências de processo infeccioso e/ou inflamatório há pelo menos três meses e sem alteração do perfil eletroforético de hemoglobina (AA).

5.5 Coleta de dados

5.5.1 Informações clínicas, laboratoriais e demográficas

Os dados clínicos, hematológicos, bioquímicos e demográficos necessários para este estudo foram coletados a partir de entrevista com os pacientes e por busca ativa nos prontuários médicos dos mesmos. Tais informações foram transferidas para a Ficha clínica de estudo e acompanhamento do paciente com anemia falciforme (APÊNDICE B), e mantidas em sigilo de pesquisa. Os testes hematológicos foram realizados fazendo-se uso do equipamento Analisador Hematológico CELL-DYN Ruby (Abbott Diagnostics®, Illinois, USA).

Informações referentes ao uso de medicação específica, esquema terapêutico adotado e as manifestações fenotípicas da doença ao longo dos anos, bem como, o histórico de episódios de crises álgicas, necessidades de internação e de transfusão sanguínea e diagnóstico de complicações agudas, nos últimos 12 meses, também foram abordados no questionário e considerados decisivos para a seleção dos pacientes.

Todas as informações foram confirmadas por meio de consultas aos prontuários médicos e aos *softwares* de bancos de dados das instituições envolvidas, passando, em seguida, a alimentar o banco de dados do estudo para as análises cabíveis posteriores.

5.5.2 Coleta das amostras biológicas

A coleta do sangue periférico dos pacientes em estudo foi realizada no ambulatório do hospital e hemocentro partícipes, por punção venosa, em virtude da presença dos pacientes para a consulta médica e/ou exames laboratoriais de rotina. Utilizou-se de dois tubos *Vacutainer*®, um com ativador de coágulo à seco e gel separador e outro contendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. As amostras de sangue coletadas foram usadas para as análises de parâmetros hematológicos, marcadores bioquímicos e para obtenção do *pool* celular para a extração do material genético

A coleta do sangue dos indivíduos saudáveis foi realizada no hemocentro participante em virtude da presença destes para a doação voluntária de sangue.

5.6 Métodos experimentais

5.6.1 Testes seletivos para investigação de perfil de hemoglobinas

Todas as amostras passaram pelos testes de triagem laboratorial para caracterização do perfil de Hb e, posteriormente, os genótipos dos indivíduos foram confirmados por biologia molecular. Os ensaios referentes à identificação e quantificação do perfil de Hb de cada amostra que constitui o estudo foram executados por profissionais técnicos dos laboratórios das próprias instituições que atendem aos pacientes, e fazem parte do protocolo institucional. Dentre as técnicas clássicas de diagnóstico, foram utilizadas as descritas a seguir.

5.6.1.1 Preparação de hemolisados

Para que as amostras fossem submetidas aos procedimentos eletroforéticos de identificação das frações de Hb, os eritrócitos foram separados do plasma, por centrifugação, e lisados para a obtenção da solução de Hb, aplicando-se a técnica do hemolisado rápido (NAOUM, 1999). Para tanto, foi utilizado como hemolisante, o detergente biológico saponina, numa concentração de 1,0%.

Hemolisado Rápido com Saponina:

Reativo hemolisante:

- Saponina P.A. 1 g
- Água destilada q.s.p..... 100 mL

Procedimento: Adicionou-se o volume de 100 μ L de sangue periférico colhido em EDTA ao volume de 200 μ L de reativo hemolisante em um tubo de vidro pequeno. A seguir, realizou-se a homogeneização até obtenção da hemólise total da mistura. Este hemolisado foi utilizado logo após o preparo.

5.6.1.2 Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino

Princípio: Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb variantes, com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais (modificado de MARENGO-ROWE, 1965) .

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6:

- Tris hidroximetil aminometano 10,2 g

- Ácido etilenodiaminotetracético 0,6 g
- Ácido Bórico 3,2 g
- Água destilada q.s.p 1000 mL

Procedimento: Após imersão numa solução tampão de TEB, durante 15 minutos, as fitas de acetato de celulose foram secas, com auxílio de papel absorvente, e colocadas no suporte da cuba de eletroforese, de forma que mantivessem contato com a solução tampão presente nos dois compartimentos da cuba. A solução de hemolisado de Hb foi aplicada nas fitas de celulose com distância de 1,0 cm da extremidade da fita que estava em contato com o polo negativo, recebendo 300 volts, por cerca de 30 minutos, para a separação das frações de Hb.

A análise das frações foi realizada sem coloração, por comparação com amostras controle: padrão normal HbAA, padrão HbAS, padrão HbAC. A eletroforese alcalina em acetato de celulose permite a separação de Hb normais e grande parte das anormais.

5.6.1.3 Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido

Princípio: Técnica utilizada para diferenciação de alguns tipos de Hb variantes, que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino. Os hemolisados, previamente preparados, foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de ágar-fosfato, pH 6,2 (VELLA, 1968).

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 (Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel)

- Na₂HPO₄ 2,02 g
- NaH₂PO₄.H₂O 7,66 g
- Água destilada q.s.p 1000 mL

Gel de Ágar-Fosfato:

- Ágar-ágar 500 mg
- Tampão fosfato pH 6,2..... 25 mL

Procedimento: Após a confecção do gel de ágar-fosfato tamponado e das lâminas de microscopia contendo o gel e as amostras a serem estudadas, foi utilizado papel filtro para promover a conexão entre o gel e os compartimentos eletrolíticos, passando 100 volts durante 30 minutos. As lâminas foram coradas, com Ponceau, a fim de permitir melhor observação e interpretação das frações de Hb obtidas.

5.6.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Princípio: Foi utilizado o equipamento VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota (Bio-Rad, Califórnia, USA). O método consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorvância a 415 nm. Um segundo filtro de 690 nm corrigiu a linha de base que podia apresentar alterações provocadas pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância *versus* tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb, sendo característico para cada tipo de Hb.

Procedimento (*Instruction Manual Of Bio-Rad*, 2006): Foram diluídos 05 µL da amostra de sangue total, colhido com EDTA, em 1,0 mL de solução hemolisante, fornecida no kit de análise. Após hemólise total dos eritrócitos, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento. Os procedimentos foram realizados conforme a pré-programação de leitura das amostras. O kit de análise utilizado é capaz de separar e quantificar as porcentagens para as hemoglobinas A₂ e F, além de identificar as variantes mais comuns como as hemoglobinas S, D, C e E.

A quantificação das diferentes frações de Hb em cada amostra foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparadas com os valores de calibração específicos, fornecidos pelo fabricante, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico.

5.6.2 Análises de expressão gênica

5.6.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA total do *pool* celular do sangue periférico dos indivíduos participantes do estudo foi realizada conforme protocolo do fabricante do reagente Trizol (*Trizol LS Reagent® - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Após centrifugação do sangue total à 4000 rpm, por 10 min, e retirada do plasma e eritrócitos contaminantes com solução lisante de cloreto de amônio (NH₄Cl 0,83% (com pH 7,2 a 37°C)), foi adicionado, ao *pellet* leucocitário,

750 μ L do reagente Trizol e realizada homogeneização do material, com auxílio de uma pipeta, até completa dissolução do mesmo. Após a fase de lise celular, a cada tubo de amostra foi acrescentado 10 μ L de glicogênio (age como um carreador para auxiliar a precipitação de RNA) e 200 μ L de clorofórmio gelado (que solubiliza os lipídeos, permitindo sua remoção), seguido de agitação no vórtex por 30 segundos e centrifugação a 14000 rpm, a 4°C. O sobrenadante, rico em RNA, foi, cuidadosamente, transferido para um novo tubo para se evitar contaminação com a interfase, rica em DNA.

A precipitação do RNA, foi possível pela adição de 500 μ L de isopropanol gelado, seguida de homogeneização e incubação a -20°C, *overnight*. Depois do descongelamento das amostras em banho de gelo, foi realizada nova centrifugação a 14000 rpm, durante 15 min, a 4°C. Feito descarte de todo o sobrenadante e ressuspensão do *pellet* com 1 mL de etanol 75% gelado, seguido de agitação no vórtex e 14000 rpm de centrifugação, por 15 min, a 4°C. Após descarte do sobrenadante por inversão do tubo, deixou-se o tubo secar (invertido) por 15 min, em temperatura ambiente, sendo, então, ressuspendido o precipitado de RNA em água estéril, livre de RNase, perfazendo um volume final de 20 μ L.

A qualidade do RNA extraído foi determinada pela relação $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e a sua concentração quantificada por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop™ Spectrophotometers -T042 TECHNICAL BULLETIN (Thermo Fisher Scientific-USA).

5.6.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada, a partir do RNA total isolado na etapa anterior, através da reação de transcrição reversa, utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems®-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Os procedimentos referentes à síntese do cDNA obedeceram às recomendações do fabricante do kit de transcrição supracitado. Após esse processo, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a uma temperatura de -20°C, até o momento das análises moleculares.

5.6.2.3 Teste de reação em cadeia da polimerase-quantitativo em tempo real (qPCR)

A detecção da amplificação e quantificação da expressão gênica dos quatro genes alvos mensurados neste estudo (TABELA 5), e do gen endógeno utilizado, foram realizadas a partir da análise da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando-se o equipamento *CFX96 Real-time System* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California,

USA). As reações foram preparadas a partir do reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA), otimizado para reações com sondas *TaqMan assay®* e contendo a *AmpliTaq Gold* DNA polimerase, os dNTPs e tampão otimizados.

Para normalizar os dados de expressão dos genes alvos, o gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi utilizado como controle endógeno (TABELA 5). A escolha do *GAPDH* como controle endógeno, neste experimento, deu-se por busca na literatura, sendo bem descrito e caracterizado por sua estabilidade e uso como único gene normalizador e calibrador em diversos estudos envolvendo qPCR na doença falciforme (ARMENIS *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2018; PAREDES *et al.*, 2019; WEBER *et al.*, 2018).

Tabela 5 - Genes utilizados na avaliação da expressão gênica por qPCR em tempo real

GENES	SIGLA	MECANISMO ENVOLVIDO	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
GENES DE ESTUDO			
<i>Hypoxia-inducible factor-1a</i>	<i>HIF-1a</i>	Transcrição de diversos genes em resposta à hipóxia	Hs00153153_m1
<i>Ataxia Telangiectasia Mutada</i>	<i>ATM</i>	Dano/reparo de DNA	Hs01112344_m1
<i>Ataxia Telangiectasia Mutada Rad 3 Related</i>	<i>ATR</i>	Dano/reparo de DNA	Hs011112344_m1
<i>Vascular endothelial growth factor</i>	<i>VEGF</i>	Angiogênese	Hs00900054-m1
GENE NORMALIZADOR			
<i>Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	-	Hs02786624_g1

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Todos os preparos e armazenamentos dos materiais foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, sendo otimizado o volume final de cada reação para 10 µL, dos quais, 2,5 µL era de cDNA. Cada amostra foi avaliada em duplicata e foram consideradas para análise somente as amostras cujas diferenças de amplificação não excederam a 0,8 ciclos ($\Delta Cq \leq 0,8$), conforme preconizado por Vandesompele *et al.* (2002). As reações foram preparadas em placas transparentes de 96 poços e seladas com material adesivo apropriado para microplacas ópticas, resistente a ação do álcool e temperaturas elevadas. Todas as etapas do procedimento desta técnica foram realizadas com as amostras e reagentes imersos em gelo e na presença de pouca exposição à luz.

Em todas as placas, foram realizados controles negativos (NTC, *no-template controls*) das reações, em duplicata, para todos os genes estudados, sendo que, nestes NTC foram

adicionados 2,5 µL de água ultrapura substituindo a amostra de cDNA. Todas as reações que mostraram amplificação para qualquer um dos controles negativos foram desconsideradas.

Adicionalmente, foi utilizado uma amostra de referência (REF), em duplicata, a fim de padronizar e validar todas as placas do experimento. A amostra referência foi composta por um *pool* de três cDNAs provenientes de amostras de pacientes pertencentes ao estudo, sendo escolhidas de forma aleatória, e, obrigatoriamente, constante em cada placa.

Os resultados foram avaliados através do software *CFX System* (*Bio-Rad Laboratories, Inc.*, Hercules, Califórnia, USA) para obtenção dos valores de *quantification cycle* (Cq, ciclo de quantificação) ou *threshold cycle* (Ct, ciclo limiar). Apesar de considerados sinônimos, as diretrizes do MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) propõem o uso da terminologia Cq, de acordo com o padrão de dados RDML (Real-Time PCR Data Markup Language) (<http://www.rdml.org>) (BUSTIN *et al.*, 2009).

Ao final de cada corrida, os dados de Cq foram exportados para uma planilha do software *Excel* (*Microsoft Corporation*) para o cálculo dos valores de ΔCq , de $2^{-\Delta Cq}$ e $2^{-\Delta\Delta Cq}$, tanto dos genes alvos, quanto do gene endógeno. O ΔCq foi calculado utilizando as diferenças da média de Cq entre os genes alvos e seu controle endógeno.

5.6.3 Análises de marcadores bioquímicos

Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos e que descrevem perfis hemolíticos, hepáticos e renais (fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, gama-glutamil transferase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, bilirrubina total e direta, creatinina, uréia, ácido úrico, ferro e ferritina) foram coletados diretamente dos prontuários dos pacientes ou de *softwares* das instituições partícipes. Os testes bioquímicos foram mensurados por método automatizado, no equipamento Analisador Bioquímico Automático CMD 800i X1 (WIENER-LAB GROUP, Rosario, Argentina), conforme especificações dos fabricantes dos kits de reagentes e princípios de cada teste descritos, sucintamente, a seguir:

- Dosagem sérica de Fosfatase Alcalina (Kit ALP 405 AA- Wiener Lab, Rosario, AR): Método cinético otimizado (DGKC e SSCC) a 405 nm.

Fundamentos do método: A fosfatase alcalina (ALP ou monoésteres ortofosfórico fosfohidrolase) hidrolisa ao p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que não tem cor, produzindo fosfato e p-nitrofenol em pH alcalino. A velocidade da aparição do ânion p-nitrofenolato (de cor amarela) é proporcional à atividade enzimática da amostra.

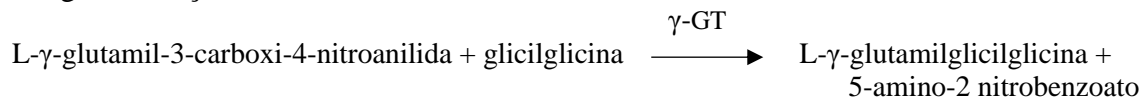
- **Dosagem sérica de Lactato Desidrogenase (LDH)** (Kit LDH-P UV AA Líquida-Wiener Lab, Rosario, AR): Método UV otimizado (SFBC) para determinação de LDH, em soro ou plasma.

Fundamentos do método: A mensuração da LDH baseia-se no seguinte esquema de reação:



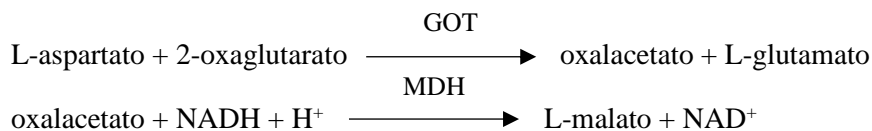
- **Dosagem sérica de Gama-Glutamil Transferase (GGT)** (Kit Gama-GT-Test Cinética AA Liq-Wiener Lab, Rosario, AR): Método (Szasz modificado) para a determinação de GGT em soro ou plasma.

Fundamentos do método: A γ -glutamil transferase é uma carboxipeptidase que catalisa a seguinte reação:



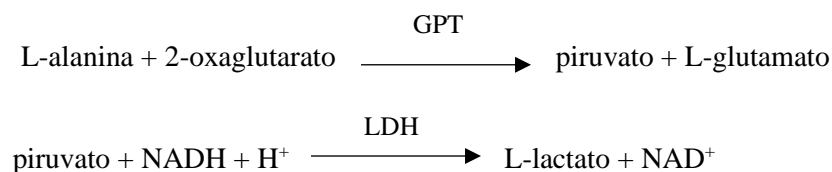
- **Dosagem sérica de Aspartato Aminotransferase** (Kit GOT (AST) UV AA Líquida-Wiener Lab, Rosario, AR): Método UV otimizado (IFCC) para a determinação de Aspartato Amino-transferase (GOT/AST) em soro ou plasma.

Fundamentos do método: Baseado no seguinte esquema de reação:



- **Dosagem sérica de Alanina Aminotransferase** (Kit GPT (ALT) UV AA Líquida-Wiener Lab, Rosario, AR): Método UV otimizado (IFCC) para a determinação de Alanina Aminotransferase (GPT/ALT) em soro ou plasma.

Fundamentos do método: Baseado no seguinte esquema de reação:



- **Dosagem sérica de Bilirrubina Total** (Kit Bilirrubina Total AA Líquida- Wiener Lab, Rosario, AR): Método DPD para a determinação de bilirrubina total em soro ou plasma.

Fundamentos do método: A bilirrubina indireta, unida à albumina, é liberada por um tensoativo. A bilirrubina total reage com o sal de diclorofenildiazonio (DPD) produzindo um azo composto cor vermelho em solução ácida.

- **Dosagem sérica de Bilirrubina Direta** (Kit Bilirrubina Directa AA Líquida- Wiener Lab, Rosario, AR): Método DPD para a determinação de bilirrubina direta em soro ou plasma.

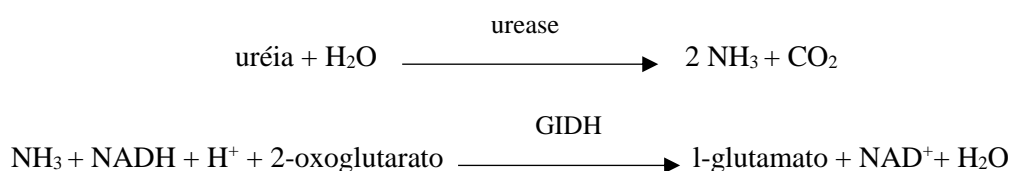
Fundamentos do método: A bilirrubina direta reage com o sal de diclorofenildiazonio (DPD) produzindo um azo composto cor vermelho em solução ácida.

- **Dosagem sérica de Creatinina** (Kit Creatinina Cinética AA Líquida- Wiener Lab, Rosario, AR): Método cinético para a determinação de creatinina em soro, plasma ou urina.

Fundamentos do método: A creatinina reage com o picrato alcalino (reação de Jaffe) produzindo um cromogênio vermelho. A velocidade desta reação, sob condições controladas, é uma medida da concentração de creatinina da amostra, posto que esta comporta-se como uma reação cinética de primeira ordem para a creatinina. Por outro lado, demonstrou-se que os cromogênios não-creatinina que interferem na maior parte das técnicas convencionais reagem dentro de 30 segundos após o início da reação. Assim, entre os 30 segundos e os 5 minutos posteriores ao início da reação, o incremento da coloração deve-se exclusivamente à creatinina.

- **Dosagem sérica de Uréia** (Kit Uréia UV Cinética AA Líquida- Wiener Lab, Rosario, AR): Método cinético UV para a determinação de Uréia em soro, plasma ou urina.

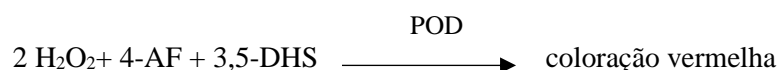
Fundamentos do método: Baseado no seguinte esquema de reação:



- **Dosagem sérica de Ácido Úrico** (Kit Uricostat Enzimático AA Líquida- Wiener Lab, Rosario, AR): Método enzimático para a determinação de ácido úrico em soro, plasma ou urina.

Fundamentos do método: O esquema da reação para dosar o ácido úrico baseia-se na seguinte reação:





Obs.: UOD: uricase; POD: peroxidase; 4-AF: 4-aminofenazona; 3,5-DHS: sal sódica de 3,5 diclorohidroxibenzeno sulfônico.

A quantidade de ácido úrico determina-se medindo a absorvância deste pigmento.

- **Dosagem sérica de Ferro** (Kit Fer – Color AA Líquida- Wiener Lab, Rosario, AR):
Método colorimétrico direto para a determinação de ferro em soro ou plasma.

Fundamentos do método: O ferro é liberado do complexo de transferrina em meio ácido e se reduz a Fe (II) com ácido ascórbico. Logo após, reage com o reagente de cor, o ferene, dando origem a um complexo de cor azul que é medido a 600 nm. A absorvância obtida é diretamente proporcional à concentração de ferro.

- **Dosagem sérica de Ferritina** (Kit Ferritin AA Turbitest- Wiener Lab, Rosario, AR):
Método imunoturbidimétrico para a determinação de ferritina.

Fundamentos do método: A ferritina presente na amostra reage com as partículas de látex sensibilizadas com anticorpos antiferritina humana produzindo aglutinação. A turbidez produzida pela aglutinação é proporcional à concentração de ferritina na amostra, sendo medida em espectrofotometria.

5.6.4 Investigação do perfil fenotípico por escores de gravidade

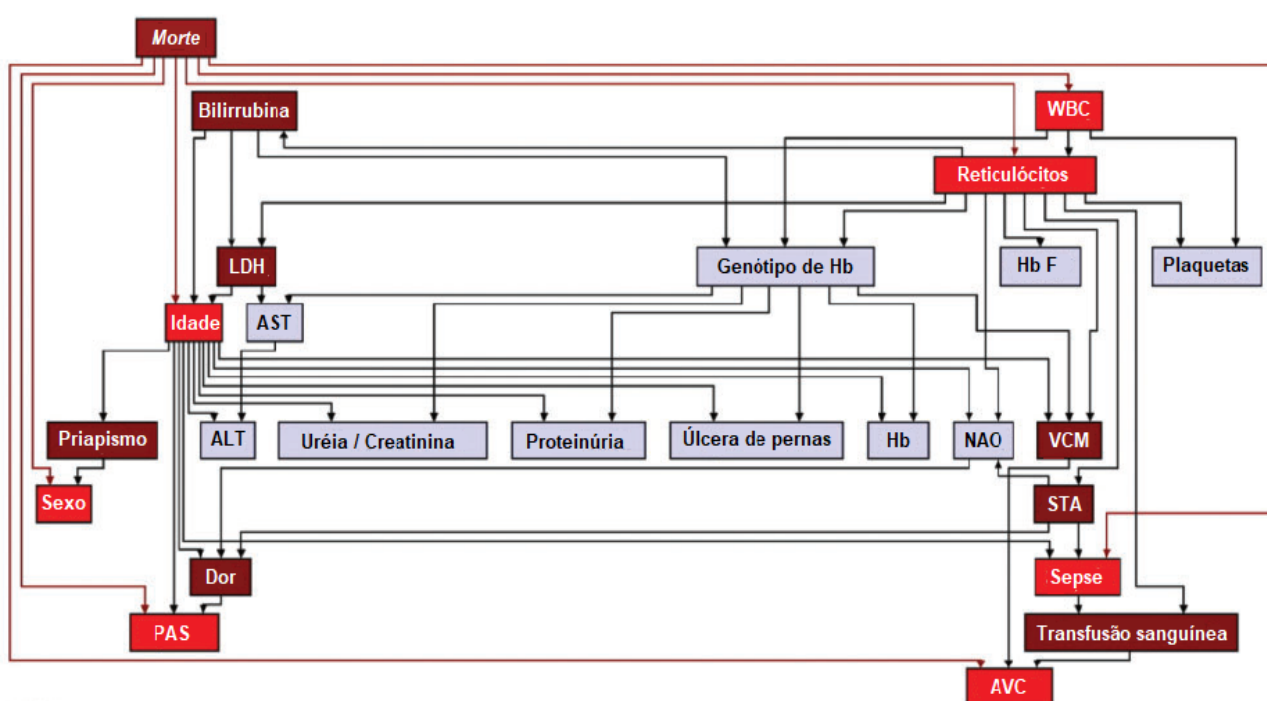
A categorização do perfil fenotípico (leve, intermediário e grave) da população em estudo foi estabelecida através de cálculos de escores de gravidade de risco de morte, obtidos por meio da ferramenta eletrônica “Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme” (*Sickle Cell Disease Severity Calculator*), disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>. Este programa foi desenvolvido e validado por um grupo de pesquisadores do *Boston University School of Public Health*, nos EUA, por meio de modelagem de rede Bayesiana, envolvendo um grupo amostral de 3.380 pacientes acompanhados pelo Estudo Cooperativo da Doença Falciforme (*Cooperative Study of Sickle Cell Disease - CSSCD*), projetado para descrever os aspectos clínicos e laboratoriais da doença falciforme (SEBASTIANI *et al.*, 2007).

Através de um modelo matemático de probabilidades, esta ferramenta aborda, de forma simples e intuitiva, a predição de gravidade por meio de relações de causalidade das variáveis

de um problema, que, no caso em questão, são os parâmetros clínicos e laboratoriais da pessoa com doença falciforme (13 exames laboratoriais, 07 eventos clínicos e informações demográficas e de tratamento) (FIGURA 17).

O valor preditivo do referido modelo e instrumento, ou seja, a precisão da previsão de morte com base em um perfil clínico e laboratorial, foi validado em duas vertentes do estudo, independentes, e mostrou alta especificidade e sensibilidade (SEBASTIANI *et al.*, 2007).

Figura 17 - Rede de associações entre morte, complicações clínicas e achados laboratoriais na doença falciforme



Fonte: Adaptado de Sebastiani *et al.* (2007).

As caixas coloridas em vermelho são suficientes para prever o risco de morte a curto prazo (scores de gravidade). As caixas coloridas em azul estão associadas a fatores preditivos em vermelho. Por exemplo, o genótipo de Hb está associado a várias variáveis laboratoriais, incluindo leucócitos, VCM e, portanto, modula a gravidade da doença indiretamente por esses fatores. Abreviações: LDH (lactato desidrogenase); ALT (alanina aminotransferase); AST (aspartato aminotransferase); PAS (pressão arterial sistólica); Hb F (hemoglobina fetal); NAO (necrose avascular óssea); WBC (leucócitos totais); VCM (volume corpuscular médio); STA (síndrome torácica aguda); AVC (acidente vascular cerebral).

A classificação do fenótipo do paciente falciforme, por meio deste instrumento, é baseada na observação de que o escore de gravidade tem uma curva em formato de “U” que sofre mudanças de acordo com a idade da população em que é aplicada, conforme demonstra a figura 18. Este modelo de rede calcula o risco de morte dentro de 05 (cinco) anos e considera este risco como um escore de gravidade da doença, com valores variando de 0 (zero) (menos grave) a 1 (um) (mais grave).

Em 2015, a Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme também foi aplicada e validada em uma população de pacientes do Brasil com o objetivo de testar a viabilidade do uso dessa ferramenta em grupo de indivíduos distintos da população original do estudo, demonstrando também ter elevada sensibilidade e alto valor preditivo positivo (BELINI JUNIOR *et al.*, 2015).

Figura 18 - Critérios de escores e classificação fenotípica da doença falciforme pela Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme

Pacientes > 40 anos de idade												
0.1	0.2	0.3	0.4	0.401	0.5	0.6	0.7	0.8	0.801	0.9	1.0	
escores de gravidade												
Pacientes ≤ 40 anos de idade												
0.1	0.2	0.3	0.4	0.401	0.5	0.599	0.6	0.7	0.8	0.801	0.9	1.0
escores de gravidade												
LEVE				INTERMEDIÁRIO				GRAVE				

Fonte: Adaptado de Belini Junior *et al.* (2015).

5.7 Análises estatísticas

Aos resultados obtidos pela coleta de dados e realização dos métodos experimentais, ambos já descritos na seção anterior, testes estatísticos específicos foram aplicados para a análise e interpretação dos parâmetros e informações mensuradas. Tais parâmetros e dados foram considerados como variáveis em todas as análises, sendo descritas tanto de forma univariada, onde cada variável é estudada isoladamente, como de forma bi ou multivariada, em que é analisado o comportamento de duas, ou mais, variáveis simultaneamente. Adicionalmente, as variáveis aqui apresentadas foram ponderadas tanto como média (e desvio padrão), mediana (e intervalo interquartil (IIQ)) ou como frequência (percentagem), conforme apropriado.

Os testes de hipóteses de significância utilizados variaram de acordo com o tipo de variável em análise e objetivo proposto, sendo adotado o valor $p < 0,05$ para significância estatística em todas as análises. Desta forma, para variáveis tipo categórica *versus* categórica, foram aplicados os testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher; categórica (até duas categorias) *versus* qualitativa, foi utilizado o Teste Mann-Whitney; categórica (mais de duas categorias) *versus* quantitativa, o Teste de Kruskal Wallis e o pós teste de comparações múltiplas de Dunn,

e para as análises de correlações quantitativa *versus* quantitativa, foi executado o Teste de Correlação de Pearson.

Vale destacar ainda que as análises estatísticas realizadas foram desenvolvidas com o auxílio dos softwares: *CFX System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA)*; *IBM SPSS 22 (Statistic Package for Social Science, v. 22.0)*; *Software R, v. 3.5.5* e *Microsoft Office Excel 2016*.

6 RESULTADOS

Com o propósito de realizar uma investigação mais ampla e acurada sobre a expressão e ingerência genética em resposta à condição de hipóxia em pacientes com AF, os resultados e análises, aqui apresentados, seguirão o seguinte fluxo didático:

- Caracterização da população de pacientes do estudo reunida em um só universo amostral;
- Análise dos dados dos pacientes, categorizados conforme o uso ou não da abordagem terapêutica com HU;
- Análise dos dados dos pacientes em terapia com HU, conforme dose de medicamento administrado.

6.1 Caracterização dos pacientes do estudo

Dos 106 (cento e seis) pacientes com AF que concordaram em participar do presente estudo, apenas 97 (noventa e sete) estavam aptos e favoráveis ao prosseguimento do mesmo, conforme os critérios de inclusão estabelecidos e observados. Do número inicial (106), 09 (nove) indivíduos foram considerados não qualificados ou habilitados o suficiente para seguimento no estudo. Dentre os principais motivos de corte, destacam-se: ambiguidade de informação quanto à homozigose para Hb S nos prontuários (3 pacientes); prontuários médicos com informações não idôneas ou com dados incompletos que poderiam comprometer as análises estatísticas (4); perda, ou insuficiência, de material biológico durante os processamentos (3) e incoerência ou dubiedade 'paciente-prontuário' quanto às especificidades do tratamento (3). Vale ressaltar que alguns indivíduos apresentaram mais de uma das justificativas supracitadas.

Na tabela 6, encontram-se as principais características demográficas dos pacientes participantes do estudo. Analisando a mesma, observa-se que a maioria dos pacientes é acompanhada pelo ambulatório de hemoglobinopatias do hemocentro partícipe (58,76%), oriunda do interior do estado (54,64%), do sexo feminino (57,73%) e com idade média de 31,76 anos (desvio padrão (DP) de 10,83). Destes pacientes, 36,08% (n=35) apresentam pressão sistólica considerada elevada (> 120 mmHg) e o valor de índice de massa corporal (IMC) variando de 16,71 a 33,65 kg/m² (média de 21,98, DP de 3,55).

Tabela 6 – Caracterização descritiva das variáveis demográficas dos indivíduos do estudo

Variáveis	Análises estatísticas		
	Pacientes ('N')	Desvio Padrão (DP)	Percentual (%)
<i>Origem institucional</i>			
HEMOCE	57	--	58,76
HEMOCE/HUWC	3	--	3,09
HUWC	37	--	38,14
<i>Procedência</i>			
Fortaleza	40	--	41,24
Interior	53	--	54,64
Outros estados	3	--	3,09
Não consta	1	--	1,03
<i>Idade (anos)</i>	31,76 (18,00; 68,00)	10,83	--
<i>Sexo</i>			
Masculino	41	--	42,27
Feminino	56	--	57,73
<i>Pressão arterial sistólica</i>			
> 120 mmHg	35	--	36,08
≤ 120 mmHg	61	--	62,89
Não consta	1	--	1,03
<i>IMC (kg/m²)</i>	21,98 (16,71; 33,65)	3,55	--

Fonte: Dados da pesquisa.

HUWC, Hospital Universitário Walter Cantídio; IMC, índice de massa corporal. Nota: (1) Os valores de idade e IMC representam as médias (mínimo; máximo) e desvio padrão, os demais, expressam número de casos e percentual.

Quanto às variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes, estas foram analisadas em um contexto geral, conforme demonstram as tabelas 7 e 8, a fim de caracterizarmos a população participante do estudo, pacientes com AF, sendo, posteriormente, analisadas segundo estratificação de grupos de estudo, e apresentadas oportunamente. Assim, a tabela 7 apresenta a descrição do perfil laboratorial dos pacientes, enquanto a tabela 8 descreve a distribuição de frequências de complicações clínicas e comorbidades, em história pregressa (como, pneumonia, DST, hepatite, tuberculose) ou atual (tais como, diabetes, cardiopatia, úlcera nas pernas, astenia), relatadas pelos pacientes ou coletadas por meio da busca ativa em prontuários.

Tabela 7– Caracterização descritiva do perfil hematológico e bioquímico dos indivíduos do estudo

Variáveis	Análises estatísticas	
	Valor Médio (min; máx)	Desvio Padrão (DP)
<i>Perfil hematológico</i>		
Eritrócitos (milhões/mm ³)	2,59 (1,3; 4,8)	0,63
Hemoglobina (g/dL)	9,27 (5,31; 14,90)	1,67
Hematócrito (%)	27,08 (16,70; 43,60)	4,97
VCM (fL)	109,37 (11,70; 155,78)	17,55
HCM (pg)	37,47 (20,88; 48,42)	4,95
CHCM (g/dL)	34,50 (30,08; 39,20)	1,84
Leucócitos (/mm ³)	10272,68 (4449,00; 25100,00)	3792,97
Neutrófilos (/mm ³)	5448,59 (1279,00; 14442,00)	2736,42
Plaquetas (/mm ³)	375451,55 (134600,00; 659600,00)	117482,75
Reticulócitos (/mm ³)	233711,52 (47980,00; 479400,00)	88466,99
Reticulócitos (%)	9,63 (2,20; 19,94)	3,82
Hb F (%)	14,40 (1,10; 34,60)	7,11
<i>Perfil bioquímico</i>		
Uréia (mg/dL)	22,31 (8,00; 119,00)	13,98
Creatinina (mg/dL)	0,71 (0,30; 5,00)	0,55
Lactato desidrogenase (U/L)	882,59 (375,00; 1863,00)	321,54
Ácido úrico (mg/dL)	4,86 (2,40; 10,20)	1,64
Bilirrubina total (mg/dL)	3,09 (0,68; 13,57)	2,27
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,53 (0,06; 3,18)	0,44
Bilirrubina indireta (mg/dL)	2,56 (0,55; 12,80)	2,15
Aspartato aminotransferase (U/L)	43,47 (17,00; 114,00)	18,66
Alanina aminotransferase (U/L)	32,53 (10,00; 251,00)	27,20
Fosfatase alcalina (U/L)	237,38 (63,00; 505,00)	88,17
Gama glutamiltransferase (U/L)	62,27 (13,00; 344,00)	55,65
Ferro (µg/dL)	168,16 (43,00; 470,00)	98,25
Ferritina (ng/mL)	560,54 (19,90; 5689,00)	759,49

Fonte: Dados da pesquisa.

VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (1) Os valores apresentados representam as médias (mínimo; máximo) e desvio padrão.

Tabela 8 – Distribuição de frequências de complicações clínicas e comorbidades em história progressa ou não

Complicações / Comorbidades	Não	Sim	Não consta	Total
Problemas renais	65 (67,01%)	30 (30,93%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Cardiopatía	52 (53,61%)	42 (43,3%)	3 (3,09%)	97 (100%)
Dispneia	41 (42,27%)	54 (55,67%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Astenia	21 (21,65%)	58 (59,80%)	18 (18,55%)	97 (100%)
Hepatomegalia	60 (61,86%)	35 (36,08%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Crise convulsiva	86 (88,66%)	9 (9,28%)	2 (2,06%)	97 (100%)
AVC	69 (71,13%)	15 (15,46%)	13 (13,41%)	97 (100%)
Crise vaso-oclusiva	77 (79,38%)	12 (12,37%)	8 (8,25%)	97 (100%)
Colelitíase	44 (45,36%)	51 (52,58%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Infecções recorrentes	69 (71,13%)	26 (26,8%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Necrose óssea	79 (81,44%)	14 (14,43%)	4 (4,13%)	97 (100%)
Osteomielite	90 (92,78%)	5 (5,15%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Priapismo (<i>n=41</i>)*	34 (82,92%)	7 (17,08%)	--	41 (100%)
Sequestro esplênico	74 (76,28%)	15 (15,46%)	8 (8,26%)	97 (100%)
Síndrome torácica aguda	52 (53,61%)	43 (44,33%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Úlcera MMII	66 (68,04%)	30 (30,93%)	1 (1,03%)	97 (100%)
Diabetes	94 (96,91%)	1 (1,03%)	2 (2,06%)	97 (100%)
DST	92 (94,85%)	3 (3,09%)	2 (2,06%)	97 (100%)
HAS	85 (87,63%)	10 (10,31%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Hepatite	79 (81,44%)	16 (16,49%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Pneumonia	34 (35,05%)	61 (62,89%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Malária	95 (97,94%)	0 (0%)	2 (2,06%)	97 (100%)
Sepse	91 (93,81%)	3 (3,09%)	3 (3,09%)	97 (100%)
Tuberculose	93 (95,88%)	2 (2,06%)	2 (2,06%)	97 (100%)

Fonte: Dados da pesquisa.

AVC, acidente vascular cerebral; úlcera MMII, úlcera em membros inferiores; DST, doença sexualmente transmissível; HAS, hipertensão arterial sistólica. Nota: (*) Considerado apenas pacientes do sexo masculino (*n*= 41). Os valores expressam número de casos e percentual.

A tabela 9 apresenta a distribuição de frequências de variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões sanguíneas e internações dos pacientes. Nota-se que quase todos os pacientes já apresentaram crises álgicas no decorrer da vida, a saber 96,90% (94 pacientes). Dois pacientes (2,06%) relataram terem descoberto a doença na idade adulta, não associando dores já sentidas às crises álgicas falciformes, e 1 (um) paciente havia sido transferido para uma das instituições há pouco tempo, não constando tal informação no prontuário médico. 40,21% dos pacientes (*n*= 39) relataram terem sentido de 1 (uma) a 2 crises/por ano nos últimos três anos (feito média aritmética de número de dores/ 3 anos), enquanto 38,14% (*n*= 37) mencionam de 3 a 6 crises no último ano.

Quanto à variável transfusão sanguínea, 46,39% (*n*= 45) afirmaram já terem sido submetidos de 1 (uma) a 5 transfusões no decorrer da vida, enquanto 17,53% (*n*= 17) disseram nunca terem realizado transfusão. 83,50% (*n*= 81) e 71,13% (*n*= 69) relataram ausência do

procedimento (transfusão) e de internação hospitalar no último ano, respectivamente. Dos pacientes do estudo, cerca de 8,25% (n= 8) já apresentaram algum tipo de reação transfusional.

Tabela 9 – Distribuição de frequências das variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões sanguíneas e internações

Variáveis	Frequência	Percentual (%)
<i>Crise álgica em história pregressa</i>		
Não	2	2,06
Sim	94	96,90
Não consta	1	1,03
<i>Quantidade de episódios de dor nos últimos 3 anos</i>		
0	5	5,15
1 a 2	39	40,21
3 a 6	36	37,11
> 6	15	15,46
Não consta	2	2,06
<i>Quantidade de episódios de dor no último ano</i>		
0	16	16,50
1 a 2	25	25,78
3 a 6	37	38,14
> 6	17	17,52
Não consta	2	2,06
<i>Quantidade de transfusões em história pregressa</i>		
0	17	17,53
1 a 5	45	46,39
6 a 10	15	15,46
11 a 15	7	7,22
> 20	13	13,40
<i>Quantidade de transfusões no último ano</i>		
0	81	83,50
1 a 5	15	15,47
6 a 10	1	1,03
<i>Reações transfusionais</i>		
Não	88	90,72
Sim	8	8,25
Não consta	1	1,03
<i>Aloanticorpos</i>		
Não	88	90,72
Sim	8	8,25
Não consta	1	1,03
<i>Quantidade de internações decorrentes da doença</i>		
0	7	7,22
1 a 5	51	52,58
6 a 10	19	19,59
11 a 15	6	6,19
16 a 20	2	2,06
> 20	8	8,25
Não consta	4	4,12
<i>Quantidade de internações no último ano</i>		
0	69	71,13
1	17	17,53
2	6	6,19
3	2	2,06
Não consta	3	3,09

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: (1) História pregressa = algum momento da vida. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual.

A classificação dos fenótipos, de acordo com a calculadora de gravidade da doença falciforme, está apresentada na tabela 10. Dos 97 pacientes, apenas 95 dispunham de dados suficientes para utilização do instrumento e caracterização fenotípica, sendo 64,21% (n= 61) de grau leve, 18,94% (n= 18) de grau intermediário e 16,85% (n= 16) de risco grave de morte em 5 anos.

Tabela 10 – Distribuição de frequência fenotípica de risco de morte dos indivíduos do estudo

Classificação fenotípica de risco de morte	Frequência	Percentual (%)
Leve	61	64,21
Intermediária	18	18,94
Grave	16	16,85
Total	95	100

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: (1) Classificação fenotípica baseada na calculadora de gravidade da doença falciforme, disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual.

Investigando os pacientes no contexto de tratamento farmacológico e objetivando a estratificação de grupos particularizados quanto ao uso de HU, observou-se, na tabela 11, que cerca de 70,10% dos pacientes (n= 68) faziam uso de HU há pelo menos 6 meses da data de início do estudo. Destes pacientes, 19,11% (n= 13) pertencem ao grupo SSHU-0,5g, enquanto 58,82 e 22,07% pertencem aos grupos SSHU-1g (n= 40) e SSHU- \geq 1,5g (n= 15), respectivamente.

Ainda pela análise da tabela 11, verificou-se que setenta e quatro (74) pacientes relataram que usaram algum tipo de outro medicamento, excetuando HU e ácido fólico, no prazo de um ano do início do estudo, correspondendo a 76,29% de toda a amostragem, sendo os mais citados a dipirona (39,19%), o omeprazol (14,86%) e o paracetamol (8,11%).

Cerca de 4 pacientes (5,41%) afirmaram ter administrado Exjade de 6 a 10 meses do início do presente estudo.

Praticamente todos os pacientes (98,97%) faziam uso de ácido fólico desde o início do diagnóstico da doença e em apenas um prontuário (1,03%), nenhuma informação foi encontrada sobre o uso deste medicamento.

Tabela 11 – Caracterização dos pacientes com anemia falciforme, quanto ao tratamento

Variáveis	Frequência	Percentual (%)
<i>Uso de HU</i>		
Não	29	29,90
Sim	68	70,10
<i>Dose de HU (n=68)</i>		
0,5g (grupo SSHU-0,5g)	13	19,11
1g (grupo SSHU-1g)	40	58,82
≥ 1,5g (grupo SSHU-≥ 1,5g)	15	22,07
<i>Tempo de uso contínuo de HU (em anos) (n=68)</i>		
0,5 a 5	33	48,53
6 a 10	28	41,17
≥ 11	7	10,30
<i>Uso de ácido fólico</i>		
Não	--	--
Sim	96	98,97
Não consta	1	1,03
<i>Uso de outros medicamentos no ano anterior</i>		
Não	15	15,46
Sim	74	76,29
Não consta	8	8,25
<i>Principais medicamentos de uso no ano anterior</i>		
Dipirona	29	39,19
Omeprazol	11	14,86
Paracetamol	6	8,11
Tylenol	5	6,76
AAS	5	6,76
Losartana	4	5,41
Exjade	4	5,41
Cetoprofeno	3	4,05
Carbamazepina	3	4,05
Penicilina	3	4,05
Captopril	3	4,05
Puran T4	3	4,05

Fonte: Dados da pesquisa.

HU, hidroxuriúria; AAS, ácido acetil salicílico. Nota: (1) Resultados expressos em número de casos e percentual.

6.1.1 Análises da expressão de genes relacionados à hipóxia em pacientes com anemia falciforme

Após a descrição geral da população de estudo, quanto às características demográficas, laboratoriais, clínicas e de tratamento, que identificam e qualificam os pacientes com AF, foi mensurada e investigada, por qPCR-tempo real, a expressão de genes responsivos à condição de hipóxia. Aqui, a população de estudo é caracterizada quanto à expressão gênica de *HIF-1α*,

VEGF, *ATM* e *ATR*, e, quando possível, tais achados são relacionados aos parâmetros peculiares e inerentes à essa DF.

Sendo assim, mediante apreciação da tabela 12 e figura 19, pode-se observar que os pacientes com AF apresentam uma elevação estatisticamente significativa da expressão de todos os genes aqui investigados, quando contrastados os valores da mediana de $2^{-\Delta Cq}$ aferidos no grupo caso (pacientes falciformes) e grupo controle (indivíduos saudáveis), com valor $p < 0,01$ em todas as análises.

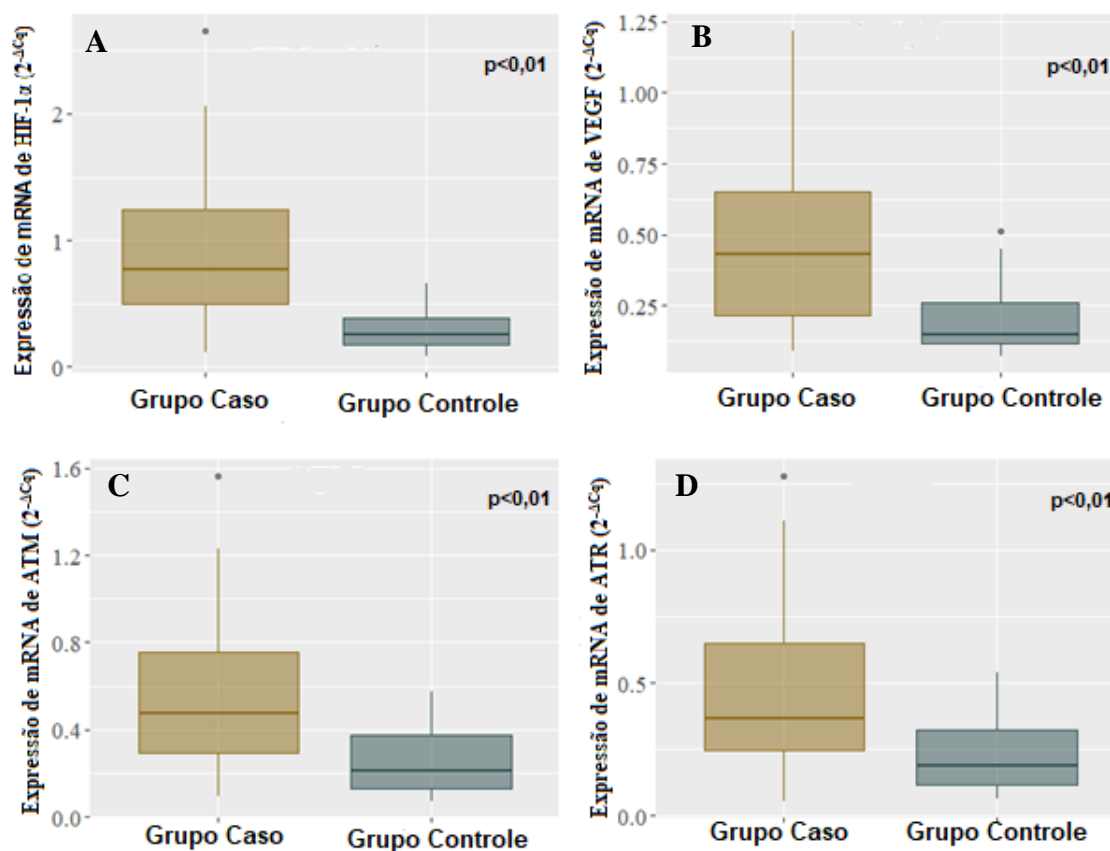
Tabela 12 – Expressão gênica de *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* em pacientes com anemia falciforme

Gene	Indivíduos	Mediana ($2^{-\Delta Cq}$)	Intervalo	Valor p
<i>HIF-1α</i>	Grupo Controle	0,26	0,23	<0,01
	Grupo Caso	0,77	0,76	
<i>VEGF</i>	Grupo Controle	0,15	0,15	<0,01
	Grupo Caso	0,43	0,45	
<i>ATM</i>	Grupo Controle	0,21	0,25	<0,01
	Grupo Caso	0,47	0,47	
<i>ATR</i>	Grupo Controle	0,19	0,21	<0,01
	Grupo Caso	0,37	0,40	

Fonte: Dados da pesquisa.

Grupo caso (pacientes com anemia falciforme); grupo controle (indivíduos saudáveis). Nota: (1) Teste de significância aplicado: Mann-Whitney. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (3) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Figura 19 – Representação gráfica da expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* de pacientes com anemia falciforme *versus* indivíduos saudáveis



Fonte: Dados da pesquisa.

Grupo caso (pacientes com anemia falciforme); grupo controle (indivíduos saudáveis); (A) Expressão de gene *HIF-1 α* ; (B) Expressão do gene *VEGF*; (C) Expressão do gene *ATM*; (D) Expressão do gene *ATR*. Nota: (1) Teste de significância aplicado: Mann-Whitney. (2) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Nos cruzamentos das variáveis demográficas, tempo de uso de HU e concentrações de Hb F com a expressão gênica (TABELA 13), verifica-se que apenas entre os parâmetros de Hb F e expressão gênica houve associação estatisticamente significativa (*HIF-1 α* e *VEGF versus* Hb F), visto que, nas demais variáveis, o valor p foi maior que o nível de significância adotado de 5%.

Vale salientar que para esta análise, a variável Hb F foi tratada em escalas de níveis de concentrações, utilizando-se de dois tipos de sistemas de categorização, conforme demonstrados em outras fontes da literatura: Categorização tipo I, com 4 categorias, e Categorização tipo II, com 3 categorias.

Tabela 13 – Cruzamento da expressão de genes relacionados à hipóxia e particularidades demográficas e clínicas de pacientes com anemia falciforme

Variáveis	Expressão Gênica ($2^{-\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
<i>Sexo</i>								
Masculino	0,78 (0,71)	0,49	0,45 (0,36)	0,49	0,48 (0,42)	0,65	0,41 (0,35)	0,47
Feminino	0,76 (0,85)		0,41 (0,48)		0,43 (0,48)		0,35 (0,43)	
<i>Faixa etária</i>								
18 a 28 anos	0,63 (0,76)	0,14	0,34 (0,44)	0,09	0,38 (0,4)	0,06	0,36 (0,44)	0,4
29 a 39 anos	0,8 (0,91)		0,48 (0,4)		0,52 (0,37)		0,45 (0,45)	
≥ 40 anos	0,94 (0,67)		0,45 (0,36)		0,63 (0,52)		0,33 (0,39)	
<i>Pressão arterial sistólica</i>								
> 120 mmHg	0,85 (0,7)	0,76	0,35 (0,36)	0,33	0,42 (0,42)	0,38	0,33 (0,36)	0,17
≤ 120 mmHg	0,7 (0,78)		0,45 (0,5)		0,48 (0,48)		0,41 (0,4)	
<i>Tempo de uso de HU (anos)</i>								
0,5 a 5	0,63 (0,59)	0,77	0,33 (0,37)	0,86	0,38 (0,28)	0,59	0,34 (0,28)	0,70
6 a 10	0,65 (0,45)		0,35 (0,35)		0,42 (0,34)		0,34 (0,38)	
≥11	0,46 (1,05)		0,32 (0,4)		0,32 (0,62)		0,65 (0,53)	
<i>Hb F - Categorização I</i>								
<15%	0,99 ^a (0,93)	<0,01	0,45 ^a (0,47)	0,04	0,51 (0,56)	0,06	0,44 (0,45)	0,23
15 a 20%	0,71 ^{ab} (0,7)		0,37 ^{ab} (0,36)		0,4 (0,42)		0,35 (0,32)	
20,1 a 25%	0,43 ^b (0,34)		0,28 ^{ab} (0,4)		0,27 (0,33)		0,64 (0,81)	
>25%	0,57 ^{ab} (0,41)		0,2 ^b (0,31)		0,42 (0,44)		0,27 (0,24)	
<i>Hb F - Categorização II</i>								
<10%	0,86 ^a (1,12)	<0,01	0,47 ^a (0,41)	0,03	0,51 (0,55)	0,10	0,39 (0,42)	0,95
10,1 a 20%	0,92 ^a (0,65)		0,43 ^{ab} (0,48)		0,45 (0,47)		0,38 (0,37)	
>20%	0,47 ^b (0,4)		0,22 ^b (0,35)		0,35 (0,31)		0,36 (0,45)	

Fonte: Dados da pesquisa.

HU, hidroxúria; Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Para as variáveis Sexo e PAS foi utilizado o teste Mann-Whitney e para as variáveis Faixa etária, Tempo de uso de HU e concentrações de Hb F, o Teste de Kruskal Wallis. (3) As letras nas caselas referem-se ao resultado do teste de comparações múltiplas de Dunn. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos. (4) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Algumas das comorbidades/intercorrências e manifestações/complicações clínicas apresentadas pelos pacientes foram analisadas em cruzamentos com a expressão genética (TABELAS 14 e 15, respectivamente), dos quais pode-se concluir que:

- Nas condições do experimento e população estudada, existe relação significativa do gene *HIF-1 α* com a crise convulsiva e colelitíase. Observa-se que quem não teve crise convulsiva apresenta expressão de *HIF-1 α* maior do que quem teve (0,82 > 0,45; p=0,01), enquanto pessoas que apresentam colelitíase possuem uma menor expressão gênica do que as que não possuem (0,65 < 0,9; p=0,04).
- Existe relação do gene *ATM* com a presença de cardiopatia e úlceras de membros inferiores. Nota-se que quem não apresenta nenhuma cardiopatia exibiu uma maior

expressão gênica do que quem é acometido por algum tipo de complicação cardíaca ($0,58 > 0,41$; $p=0,01$). Pacientes com úlceras nas pernas apresentam valores de *ATM* menores do que quem não as têm ($0,41 < 0,51$; $p=0,048$).

- Existe relação significativa do gene *ATR* com a presença de cardiopatia. Onde quem não apresenta algum tipo de cardiopatia tem expressão maior do que quem é acometido ($0,48 > 0,34$; $p=0,048$).
- Embora tenham sido identificadas várias tendências estatísticas relevantes, nenhuma associação significativa foi observada entre as variáveis analisadas e o gene *VEGF*.
- Todos os demais cruzamentos não apresentaram diferenças significativas, pois os valores p foram maiores que 0,05 (vide tabelas).

Tabela 14 – Associação da expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* com principais comorbidades e intercorrências clínicas de pacientes com anemia falciforme

Variáveis	Expressão Gênica ($2^{-\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
Problemas renais								
Não	0,78 (0,68)	0,67	0,42 (0,41)	0,52	0,43 (0,46)	0,73	0,41 (0,4)	0,80
Sim	0,68 (1,03)		0,44 (0,54)		0,52 (0,65)		0,36 (0,46)	
Cardiopatia								
Não	0,86 (0,94)	0,11	0,45 (0,53)	0,07	0,58 (0,55)	0,01	0,48 (0,41)	0,048
Sim	0,66 (0,62)		0,36 (0,34)		0,41 (0,32)		0,34 (0,33)	
Dispneia								
Não	0,7 (0,68)	0,20	0,43 (0,52)	0,65	0,44 (0,44)	0,23	0,36 (0,33)	0,29
Sim	0,86 (0,67)		0,45 (0,3)		0,48 (0,52)		0,46 (0,51)	
Astenia								
Não	0,77 (0,78)	0,86	0,43 (0,49)	0,72	0,43 (0,46)	0,25	0,37 (0,39)	0,27
Sim	0,79 (0,75)		0,46 (0,33)		0,58 (0,45)		0,52 (0,79)	
Hepatomegalia								
Não	0,79 (0,77)	0,56	0,45 (0,48)	0,21	0,49 (0,39)	0,08	0,38 (0,43)	0,97
Sim	0,7 (0,65)		0,41 (0,35)		0,4 (0,43)		0,37 (0,4)	
Crise convulsiva								
Não	0,82 (0,76)	0,01	0,44 (0,48)	0,13	0,48 (0,47)	0,07	0,39 (0,4)	0,90
Sim	0,45 (0,33)		0,24 (0,41)		0,29 (0,48)		0,33 (0,54)	
HAS								
Não	0,76 (0,8)	0,53	0,43 (0,46)	0,85	0,46 (0,46)	0,89	0,37 (0,41)	0,86
Sim	0,8 (0,69)		0,46 (0,36)		0,56 (0,51)		0,37 (0,42)	

Fonte: Dados da pesquisa.

HAS, hipertensão arterial sistólica. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Aplicado o Teste de Mann-Whitney. (3) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Tabela 15 – Associação da expressão dos genes *HIF-1α*, *VEGF*, *ATM* e *ATR* com principais manifestações/complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme

Variáveis	Expressão Gênica (2 ^{-ACq})							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
<i>AVC</i>								
Não	0,8 (0,7)	0,08	0,44 (0,45)	0,07	0,49 (0,47)	0,10	0,39 (0,4)	0,21
Sim	0,48 (1,01)		0,3 (0,46)		0,38 (0,35)		0,25 (0,37)	
<i>Crise vaso-oclusiva</i>								
Não	0,7 (0,73)	0,55	0,43 (0,48)	0,92	0,48 (0,48)	0,66	0,4 (0,41)	0,90
Sim	0,96 (0,65)		0,33 (0,38)		0,41 (0,24)		0,35 (0,35)	
<i>Colelitíase</i>								
Não	0,9 (0,84)	0,04	0,44 (0,48)	0,79	0,55 (0,57)	0,26	0,39 (0,4)	0,69
Sim	0,65 (0,68)		0,43 (0,39)		0,42 (0,42)		0,38 (0,41)	
<i>Infecções recorrentes</i>								
Não	0,71 (0,76)	0,88	0,44 (0,49)	0,20	0,48 (0,48)	0,15	0,41 (0,45)	1,00
Sim	0,82 (0,75)		0,34 (0,41)		0,4 (0,36)		0,35 (0,29)	
<i>Necrose óssea</i>								
Não	0,76 (0,76)	0,59	0,43 (0,46)	0,82	0,46 (0,47)	0,98	0,41 (0,42)	0,97
Sim	0,8 (0,69)		0,39 (0,4)		0,47 (0,48)		0,36 (0,35)	
<i>Osteomielite</i>								
Não	0,76 (0,78)	0,75	0,43 (0,45)	0,69	0,47 (0,46)	0,71	0,37 (0,4)	0,42
Sim	0,78 (0,45)		0,48 (0,47)		0,48 (0,55)		0,63 (0,48)	
<i>Sequestro esplênico</i>								
Não	0,76 (0,75)	0,29	0,43 (0,43)	0,11	0,47 (0,46)	0,10	0,37 (0,4)	0,27
Sim	1,28 (0,4)		1,12 (0,18)		1,03 (0,61)		0,63 (0,22)	
<i>Síndrome torácica aguda</i>								
Não	0,85 (0,89)	0,21	0,44 (0,52)	0,38	0,51 (0,43)	0,28	0,4 (0,38)	0,94
Sim	0,67 (0,5)		0,41 (0,36)		0,42 (0,52)		0,35 (0,43)	
<i>Úlcera MMII</i>								
Não	0,85 (0,87)	0,20	0,45 (0,48)	0,29	0,51 (0,48)	0,048	0,42 (0,41)	0,12
Sim	0,66 (0,58)		0,35 (0,36)		0,41 (0,36)		0,34 (0,44)	

Fonte: Dados da pesquisa.

AVC, acidente vascular cerebral; úlcera MMII, úlcera em membros inferiores Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Teste de Mann-Whitney. (3) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Nos cruzamentos entre os genes em estudo com variáveis relacionadas à dor, transfusões sanguíneas e internações hospitalares decorrentes da doença (TABELA 16), bem como com os fenótipos de gravidade (TABELA 17), percebe-se uma associação significativa apenas entre a quantidade de episódios de dor no último ano e os genes *VEGF* e *ATM*, dado que, somente nessas análises, os valores p obtidos foram menores que 5% (nível de significância constituído).

Portanto, pode-se concluir que pelo menos uma das categorias de quantidade de episódios de dor difere das demais com relação ao valor do gene, e de acordo com o resultado

do Teste de Dunn (letras ao lado do valor mediano), podemos afirmar quais categorias são estatisticamente diferentes, a saber:

- O valor do gene *VEGF* é significativamente diferente nas categorias “ ≤ 2 ” e “ > 8 ”, na variável: Quantidade de episódios de dor no último ano (valor de $p = 0,02$). Os pacientes que apresentaram maior quantidade de crises álgicas no último ano também apresentaram um maior nível de expressão de *VEGF*.
- A mesma situação anterior foi observada com o gene *ATM*, ou seja, os pacientes que apresentaram maior quantidade de crises álgicas no último ano também apresentaram um maior nível de expressão de *ATM*, com valor de $p = 0,02$.

Tabela 16 – Expressão gênica e variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões sanguíneas e internações de pacientes falciformes

Variáveis	Expressão Gênica ($2^{-\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
<i>Crise álgica</i>								
Não	0,84 (0,99)	0,78	0,41 (0,74)	0,78	0,29 (0,62)	0,74	0,33 (0,63)	0,98
Sim	0,76 (0,76)		0,43 (0,44)		0,47 (0,47)		0,38 (0,4)	
<i>Quantidade de episódios de dor nos últimos 3 anos</i>								
≤ 2	0,7 (0,64)	0,48	0,4 (0,37)	0,12	0,46 (0,47)	0,33	0,36 (0,28)	0,27
3 a 4	0,82 (0,88)		0,43 (0,51)		0,43 (0,4)		0,33 (0,52)	
5 a 6	0,65 (0,85)		0,44 (0,58)		0,51 (0,48)		0,48 (0,37)	
7 a 8	1,02 (0,54)		0,35 (0,28)		0,41 (0,46)		0,27 (0,6)	
> 8	1,14 (1,32)		0,58 (0,31)		0,68 (0,47)		0,63 (0,43)	
<i>Quantidade de episódios de dor no último ano</i>								
≤ 2	0,63 (0,67)	0,05	0,33 ^a (0,39)	0,02	0,38 ^a (0,42)	0,02	0,35 (0,32)	0,30
3 a 4	0,85 (0,9)		0,43 ^{ab} (0,46)		0,48 ^{ab} (0,49)		0,36 (0,45)	
5 a 6	0,76 (0,64)		0,42 ^{ab} (0,49)		0,42 ^{ab} (0,42)		0,43 (0,3)	
7 a 8	0,65 (1,08)		0,52 ^{ab} (0,42)		0,51 ^{ab} (0,41)		0,63 (0,44)	
> 8	1,16 (0,62)		0,57 ^b (0,42)		0,72 ^b (0,47)		0,58 (0,55)	
<i>Quantidade de transfusões</i>								
0	0,7 (0,76)	0,29	0,37 (0,32)	0,34	0,41 (0,54)	0,63	0,35 (0,23)	0,53
1 a 5	0,7 (0,64)		0,42 (0,51)		0,51 (0,53)		0,35 (0,48)	
6 a 10	1,19 (0,72)		0,48 (0,35)		0,51 (0,52)		0,63 (0,59)	
11 a 15	1,08 (0,96)		0,54 (0,27)		0,48 (0,12)		0,37 (0,1)	
> 20	0,57 (0,51)		0,38 (0,28)		0,37 (0,14)		0,41 (0,41)	
<i>Reações transfusionais</i>								
Não	0,78 (0,76)	0,22	0,43 (0,45)	0,19	0,47 (0,47)	0,13	0,38 (0,4)	0,29
Sim	0,34 (0)		0,14 (0)		0,13 (0)		0,21 (0)	

(continua)

Tabela 16 – Expressão gênica e variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões sanguíneas e internações de pacientes falciformes

Variáveis	Expressão Gênica ($2^{-\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
<i>Quantidade de internações decorrentes da doença</i>								
≤5	0,82 (0,81)		0,45 (0,55)		0,48 (0,49)		0,36 (0,49)	
6 a 10	0,7 (0,3)		0,4 (0,34)		0,32 (0,29)		0,34 (0,31)	
11 a 15	1,02 (1,32)	0,72	0,35 (0,44)	0,70	0,43 (0,53)	0,86	0,59 (0,43)	0,36
16 a 20	0,67 (0,08)		0,31 (0,75)		0,37 (0,61)		0,41 (0,37)	
>20	0,47 (1,07)		0,44 (0,27)		0,49 (0,28)		0,42 (0,37)	
<i>Quantidade de internações no último ano</i>								
0	0,71 (0,74)		0,43 (0,42)		0,47 (0,5)		0,35 (0,39)	
1	0,77 (1,06)	0,48	0,4 (0,5)	0,67	0,51 (0,33)	0,62	0,39 (0,46)	0,50
2	0,64 (0,51)		0,53 (0,56)		0,36 (0,57)		0,57 (0,17)	
3	1,49 (1,82)		0,72 (0,79)		0,7 (0,73)		0,52 (1,07)	

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: (1) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança (Teste de Mann-Whitney para as variáveis Crise álgica e Reações transfusionais, e Kruskal Wallis nas demais). (3) As letras nas caselas referem-se ao resultado do teste de comparações múltiplas de Dunn. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

Tabela 17 – Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes falciformes versus expressão gênica

Classificação fenotípica de risco de morte	Expressão Gênica ($2^{-\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
Leve	0,7 (0,77)		0,44 (0,49)		0,47 (0,38)		0,41 (0,41)	
Intermediária	1,07 (0,96)	0,4	0,42 (0,48)	0,9	0,51 (0,7)	0,9	0,34 (0,62)	1,0
Grave	0,7 (0,66)		0,43 (0,32)		0,46 (0,55)		0,37 (0,43)	

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: (1) Aplicado o Teste de Kruskal Wallis. (2) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. (3) Classificação fenotípica baseada na Calculadora de gravidade da doença falciforme, disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>.

6.2 Estratificação e caracterização dos grupos de estudo quanto ao uso de hidroxiuréia

Analisando os participantes do estudo quanto ao uso do medicamento HU, foram estratificados dois grupos de pacientes: grupo SS, com 29 indivíduos sem uso de HU, e grupo SSHU, composto por 68 representantes em terapia com HU. A tabela 18 expressa as principais variáveis e análises utilizadas para a caracterização demográfica e laboratorial dos pacientes falciformes com e sem terapia de HU.

Tabela 18 – Caracterização demográfica e laboratorial de pacientes falciformes, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	Análises estatísticas quanto à medicação HU		Valor p*
	SS (n= 29)	SSHU (n= 68)	
<i>Sexo</i>			
Masculino	11 (37,93%)	30 (44,12%)	--
Feminino	18 (62,07%)	38 (55,88%)	--
<i>Idade (anos)</i>	36 (19; 61) ±15,5	28 (18; 68) ±15	0,04
<i>Pressão arterial sistólica</i>			
> 120 mmHg	16 (55,17%)	19 (27,94%)	0,01
≤ 120 mmHg	13 (44,83%)	48 (70,58%)	
Não consta	--	1 (1,47%)	
<i>IMC (kg/m²)</i>	20,56 (16,71; 30,53) ±4,62	21,61 (16,86; 33,65) ±3,59	0,41
<i>Perfil hematológico</i>			
Eritrócitos (milhões/mm ³)	2,4 (0,49)	2,6 (0,81)	0,16
Hemoglobina (g/dL)	8,2 (1,54)	9,9 (2,1)	<0,01
Hematócrito (%)	23,5 (3,6)	29,3 (6)	<0,01
VCM (fL)	99,26 (12,21)	112,69 (19,97)	<0,01
HCM (pg)	34,81 (6,46)	38,8 (5,8)	<0,01
CHCM (g/dL)	34,32 (3,59)	34,47 (1,96)	0,25
Leucócitos (/mm ³)	12190 (5870)	8496 (4124)	<0,01
Neutrófilos (/mm ³)	7134 (3346)	4180 (2862)	<0,01
Plaquetas (/mm ³)	449500 (175000)	326200 (123200)	<0,01
Reticulócitos (/mm ³)	264300 (119295)	192600 (105300)	<0,01
Reticulócitos (%)	10,6 (4,45)	8,22 (5,78)	<0,01
Hb F (%)	9,1 (4,85)	16,2 (11,13)	<0,01
<i>Perfil bioquímico</i>			
Uréia (mg/dL)	27 (19,5)	18 (8)	0,01
Creatinina (mg/dL)	0,6 (0,55)	0,5 (0,2)	0,05
Lactato desidrogenase (U/L)	948 (516,5)	700 (444)	<0,01
Ácido úrico (mg/dL)	5,2 (1,75)	4,35 (1,8)	0,04
Bilirrubina total (mg/dL)	3,29 (2,53)	2,32 (1,86)	<0,01
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,67 (0,36)	0,36 (0,25)	<0,01
Bilirrubina indireta (mg/dL)	2,6 (1,7)	1,9 (1,55)	0,02
Aspartato aminotransferase (U/L)	42 (21)	38 (20)	0,16
Alanina aminotransferase (U/L)	26 (21,5)	26 (24)	0,97
Fosfatase alcalina (U/L)	243,5 (124,5)	209,5 (101,25)	0,11
Gama glutamiltransferase (U/L)	47 (43)	39 (47,25)	0,23
Ferro (µg/dL)	273 (215,5)	121 (63,5)	<0,01
Ferritina (ng/mL)	232 (557,35)	351,05 (579,38)	0,28

Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU; IMC, índice de massa corporal; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (*) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. Os valores de sexo e PAS são apresentados em número de casos e percentual. Os valores de idade e IMC representam as medianas (mínimo; máximo) e intervalo interquartil. Os valores dos perfis laboratoriais estão expressos em mediana e intervalo interquartil.

Consoante tabela acima, observa-se uma elevação significativa nos parâmetros de Hb, hematócrito, VCM, HCM e Hb F no grupo de pacientes em uso de HU, quando comparados aos pacientes sem HU, bem como uma significativa redução nos parâmetros de leucócitos, neutrófilos, plaquetas, uréia, LDH, bilirrubina e ferro, dentre outros, em igual colação.

A tabela 19 apresenta a frequência das principais manifestações clínicas e comorbidades sentidas pelos pacientes que fazem uso de HU ou não. Percebe-se, pelos dados apresentados, que o número de pessoas que sofrem/sofreram algum transtorno cardiopático é significativamente maior no grupo em terapia com HU (SSHU), em relação grupo sem HU (SS). Em contrapartida, o grupo SS apresenta um número proporcional significativamente maior de indivíduos que reclamam de dispneia.

Tabela 19 - Frequência das complicações clínicas e comorbidades em pacientes falciformes, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	Análises estatísticas quanto à medicação HU		Valor p*
	SS	SSHU	
Problemas renais (n= 30)	9 (31,03%)	21 (31,82%)	0,94
Cardiopatia (n= 42)	8 (27,59%)	34 (51,52%)	0,03
Dispneia (n= 54)	23 (79,31%)	31 (46,96%)	0,03
Astenia (n= 58)	18 (62,06%)	40 (58,82%)	1,00
Hepatomegalia (n= 35)	8 (27,59%)	27 (40,91%)	0,22
Crise convulsiva (n= 9)	0 (0%)	9 (13,64%)	0,05
AVC (n= 15)	2 (6,9%)	13 (19,11%)	0,22
Crise vaso-oclusiva (n= 12)	2 (6,9%)	10 (15,38%)	0,33
Colelitíase (n= 51)	12 (41,38%)	39 (58,21%)	0,11
Infecções recorrentes (n= 26)	5 (17,24%)	21 (31,82%)	0,14
Necrose óssea (n= 14)	4 (13,79%)	10 (15,15%)	1,00
Osteomielite (n= 5)	2 (6,9%)	3 (4,55%)	0,64
Priapismo (n= 7)**	1 (9,09%)	6 (20%)	0,22
Sequestro esplênico (n= 15)	6 (20,68%)	9 (13,63%)	0,31
Síndrome torácica aguda (n= 43)	12 (41,38%)	31 (46,97%)	0,61
Úlcera MMII (n= 30)	7 (24,14%)	23 (34,33%)	0,32
Diabetes (n= 1)	1 (3,45%)	0 (0%)	0,31
DST (n= 3)	0 (0%)	3 (4,55%)	0,55
HAS (n= 10)	2 (6,9%)	8 (12,12%)	0,72
Hepatite (n= 16)	7 (24,14%)	9 (13,64%)	0,21
Pneumonia (n= 61)	15 (51,72%)	46 (69,7%)	0,09
Malária (n= 0)	0 (0%)	0 (0%)	-
Sepse (n= 3)	0 (0%)	3 (4,55%)	0,55
Tuberculose (n= 2)	0 (0%)	2 (3,03%)	1,00

Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU; AVC, acidente vascular cerebral; úlcera MMII, úlcera em membros inferiores; DST, doença sexualmente transmissível; HAS, hipertensão arterial sistólica. Nota: (1) *Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual. (3) **Considerado apenas pacientes do sexo masculino de cada grupo.

Quanto às variáveis: crises álgicas, transfusões sanguíneas e internações hospitalares dos indivíduos do estudo, agrupados quanto ao uso ou não de HU, observou-se associação estatística significativa apenas no parâmetro ‘quantidade de episódios de dor no último ano’ que antecedeu à coleta de sangue dos mesmos (TABELA 20).

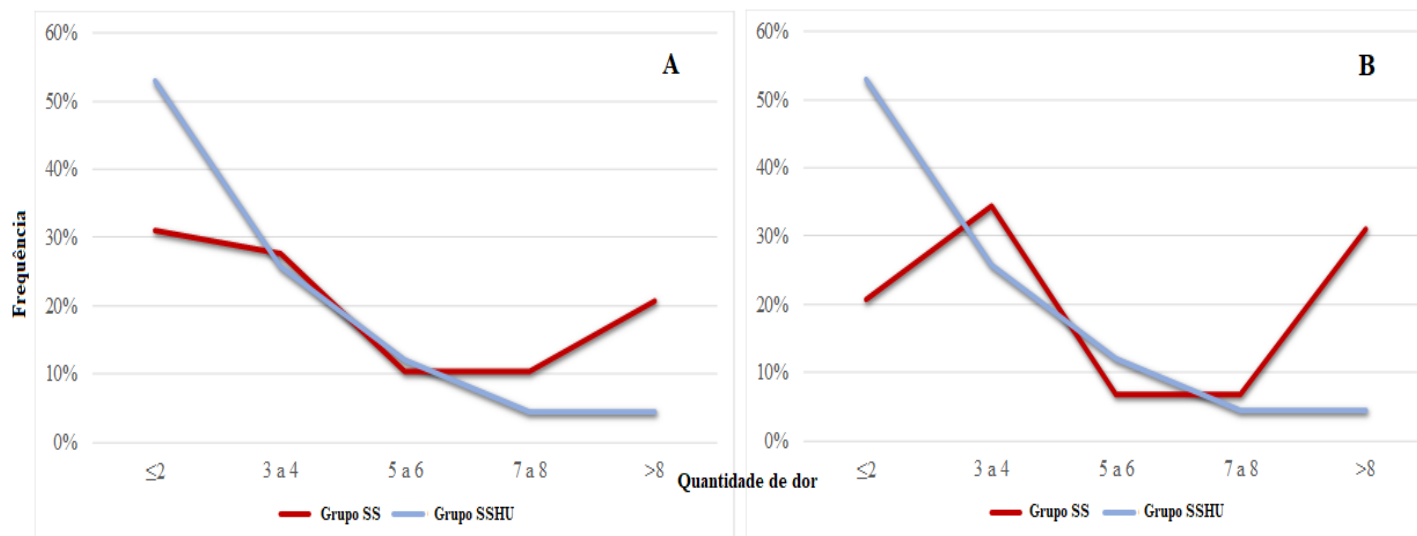
Tabela 20 - Frequências das variáveis relacionadas às crises álgicas, transfusões e internações dos pacientes falciformes, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	Análises estatísticas quanto à medicação HU		Valor p*
	SS	SSHU	
<i>Crise álgica em história pregressa</i>			
Não	1 (3,45%)	1 (1,5%)	1,00
Sim	28 (96,55%)	66 (98,50%)	
Total	29 (100%)	67 (100%)	
Não consta	--	1	
<i>Quantidade de episódios de dor no último ano</i>			
≤2	6 (20,69%)	35 (53,03%)	<0,01
3 a 6	12 (41,37%)	25 (37,87%)	
> 6	11 (37,93%)	6 (9,09%)	
Total	29 (100%)	66 (100%)	
Não consta	--	2	
<i>Quantidade de transfusões em história pregressa</i>			
0	4 (13,79%)	13 (19,11%)	0,43
1 a 5	14 (48,27%)	31 (45,58%)	
6 a 10	7 (24,13%)	8 (11,76%)	
11 a 15	2 (6,89%)	5 (7,35%)	
> 20	2 (6,89%)	11 (16,17%)	
<i>Quantidade de transfusões no último ano</i>			
0	23 (79,31%)	58 (85,29%)	0,33
1 a 5	6 (20,68%)	9 (13,23%)	
6 a 10	0	1 (1,47%)	
<i>Quantidade de internações no último ano</i>			
0	19 (65,52%)	50 (76,92%)	0,53
1	7 (24,14%)	10 (15,38%)	
2	2 (6,9%)	4 (6,15%)	
3	1 (3,45%)	1 (1,54%)	
Total	29 (100%)	65 (100%)	
Não consta	--	3	

Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU. Nota: (1) *Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual.

A figura 20 apresenta a distribuição de quantidade de episódios de dor relatada pelos pacientes com e sem tratamento com HU.

Figura 20 – Frequência de quantidade de episódios de dor relatada pelos pacientes do estudo

Fonte: Dados da pesquisa.

Grupo SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); Grupo SSHU, pacientes falciformes em uso de HU. Nota: (A) Representação esquemática de quantidade de episódios de dor nos últimos três anos. (B) Representação esquemática de quantidade de episódios de dor no último ano anterior ao estudo.

De acordo com os resultados da tabela 21, pode-se afirmar que não existe diferença estatisticamente significativa entre a classificação fenotípica de risco de morte de quem faz uso e de quem não usa a HU, pois o valor p obtido foi maior que o nível de significância adotado de 5%.

Tabela 21 – Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes com anemia falciforme versus uso e não uso de hidroxiuréia

Classificação fenotípica de risco de morte	Análises quanto ao uso de HU (n=95)		Valor p
	SS	SSHU	
Leve	18 (62,07%)	43 (65,15%)	0,27
Intermediária	8 (27,59%)	10 (15,15%)	
Grave	3 (10,34%)	13 (19,7%)	
Total	29 (100%)	66 (100%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU. Nota: (1) Resultados expressos em número de casos e percentual. (2) Classificação fenotípica baseada na Calculadora de gravidade da doença falciforme, disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>.

Realizou-se ainda o cruzamento da Hb F com o uso ou não de HU, tratando esse parâmetro como uma variável categórica e utilizando-se de dois tipos de sistema de

categorização. Em ambas as formas (Categorização I e Categorização II), os resultados foram significativos (valor $p < 0,05$), revelando, mais uma vez, a associação positiva dessa Hb com o uso de HU (TABELA 22).

Tabela 22 – Concentração de hemoglobina fetal de pacientes com anemia falciforme versus uso e não uso de hidroxiuréia

Hb F	Análises quanto ao uso de HU (n=97)		Valor p *
	SS	SSHU	
<i>Categorização I</i>			
<15%	25 (86,21%)	27 (39,70%)	<0,01
15 a 20%	4 (13,79%)	21 (30,89%)	
20,1 a 25%	0 (0%)	9 (13,23%)	
>25%	0 (0%)	11 (16,17%)	
<i>Categorização II</i>			
<10%	17 (58,62%)	16 (23,53%)	<0,01
10,1 a 20%	12 (41,38%)	32 (47,05%)	
>20%	0 (0%)	20 (29,42%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU; Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (1) *Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual

6.2.1 Análises da expressão de genes relacionados à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados quanto ao uso de hidroxiuréia

A expressão dos genes aqui analisados, *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*, foi realizada em todos os pacientes participantes do estudo, estratificados segundo o uso (grupo SSHU) ou não (grupo SS) de HU no tratamento. Vale ressaltar que, nas análises utilizando-se os valores de $2^{-\Delta Cq}$, todos os grupos de pacientes foram contrastados com o grupo controle (AA) a fim de investigar possíveis alterações ou não da expressão dos já citados genes entre os três grupos (SS, SSHU, AA). No entanto, ao analisarmos os valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, foi levado em consideração apenas a comparação dos grupos casos (grupos de pacientes) entre si.

Desta forma, ao mensurarmos e compararmos o nível de expressão dos genes em estudo entre os pacientes com AF e indivíduos saudáveis, observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos analisados, com valor de $p < 0,01$ e nível de expressão dos grupos na seguinte ordem: grupo AA < grupo SSHU < grupo SS (TABELA 23 / FIGURA 21).

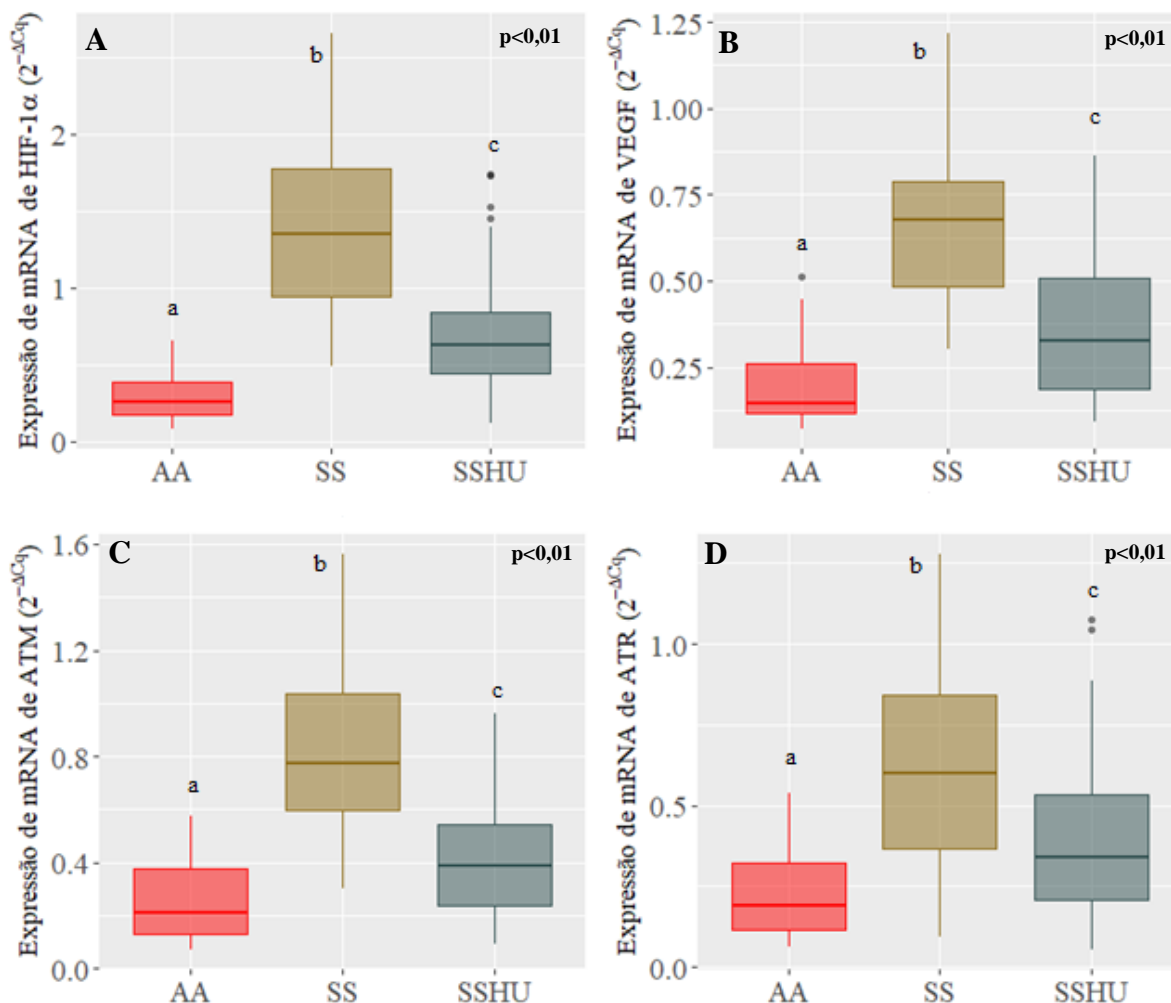
Tabela 23 – Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia, e indivíduos saudáveis ($2^{-\Delta Cq}$)

Grupos de estudo	Expressão Gênica ($2^{-\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
AA	0,26 ^a (0,23)		0,15 ^a (0,15)		0,21 ^a (0,25)		0,19 ^a (0,21)	
SS	1,35 ^b (0,87)	<0,01	0,68 ^b (0,32)	<0,01	0,77 ^b (0,5)	<0,01	0,6 ^b (0,5)	<0,01
SSHU	0,63 ^c (0,41)		0,33 ^c (0,34)		0,39 ^c (0,33)		0,34 ^c (0,35)	

Fonte: Dados da pesquisa.

AA, indivíduos saudáveis (grupo controle); SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU. Nota: (1) O teste de significância aplicado foi o de Kruskal Wallis e os resultados expressos em valor mediano e intervalo interquartil. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (3) As letras nas caselas referem-se ao resultado do teste de comparações múltiplas de Dunn. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

Figura 21 – Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, tratados ou não com hidroxiuréia e grupo controle



Fonte: Dados da pesquisa.

AA, grupo controle (indivíduos saudáveis); SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes em uso de HU; (A) Expressão do gene *HIF-1 α* ; (B) Expressão do gene *VEGF*; (C) Expressão do gene *ATM*; (D) Expressão do gene *ATR*. Nota: (1) Teste aplicado: Kruskal Wallis; pós teste: Comparações múltiplas de Dunn. (2) Resultados: mediana e intervalo interquartil. (3) Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

A tabela 24 apresenta a análise da expressão gênica entre os grupos de pacientes com e sem tratamento com HU, corroborando os dados apresentados anteriormente, onde se observa uma redução significativa na expressão de todos os genes do grupo de pacientes SSHU, quando comparados ao grupo sem tratamento. Os valores foram expressos em mediana e intervalo interquartil de $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Tabela 24 – Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, quanto ao uso ou não de hidroxiuréia ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)

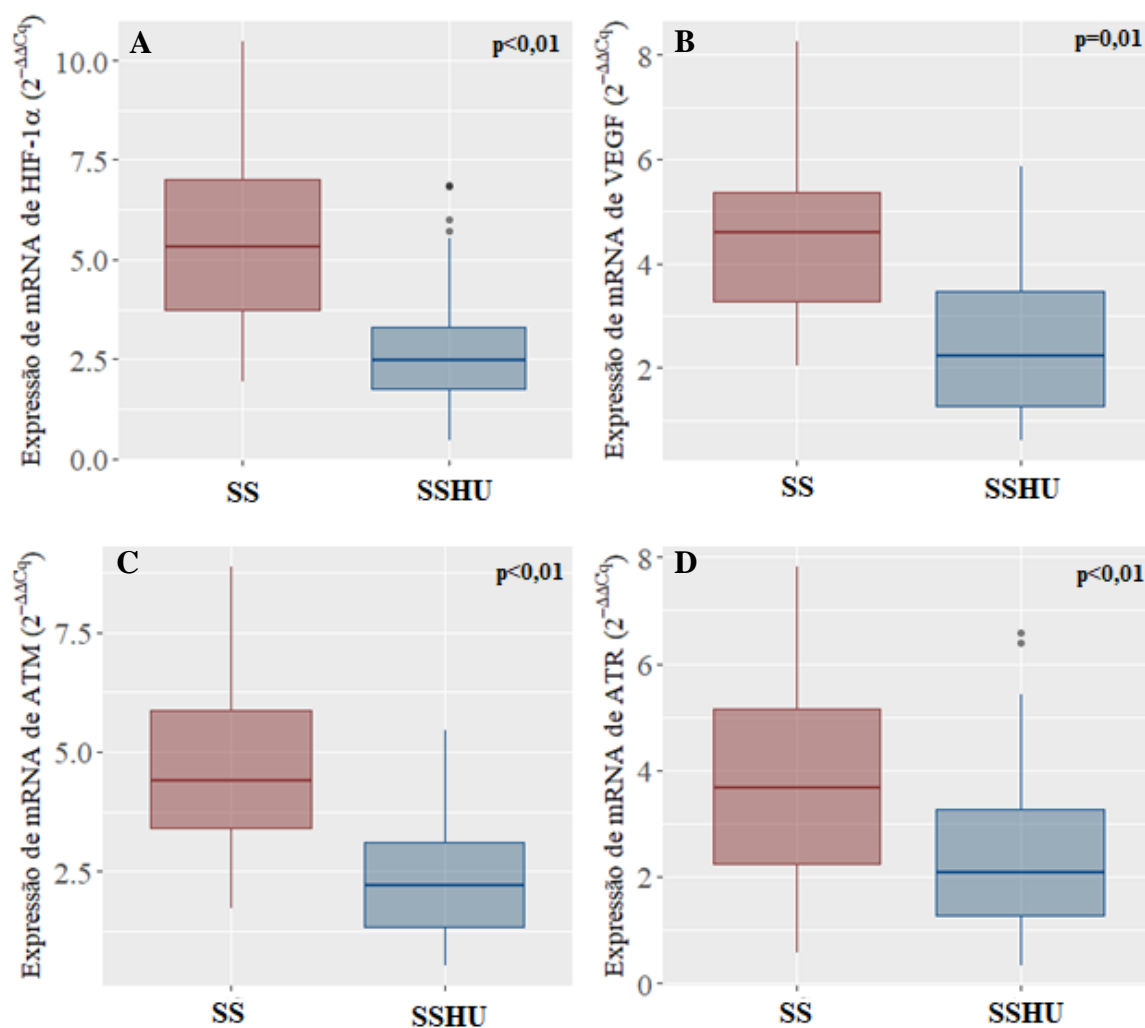
Uso de HU	Expressão Gênica ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)							
	<i>HIF-1α</i>	Valor p	<i>VEGF</i>	Valor p	<i>ATM</i>	Valor p	<i>ATR</i>	Valor p
SS	5,31 (3,45)	<0,01	4,58 (2,2)	0,01	4,39 (2,85)	<0,01	3,68 (3,05)	<0,01
SSHU	2,48 (1,63)		2,23 (2,28)		2,19 (1,86)		2,08 (2,12)	

Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU. Nota: (1) Resultados expressos em valor mediano e intervalo interquartil. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança, de acordo com o Teste de Mann-Whitney.

A figura 22 apresenta de forma visual, em *box-plot*, os dados demonstrados anteriormente, quanto ao cruzamento da expressão dos genes ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) e o uso ou não de HU pelos pacientes do estudo.

Figura 22 – Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, tratados ou não com hidroxiuréia ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)



Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU; (A) Expressão do gene *HIF-1 α* ; (B) Expressão do gene *VEGF*; (C) Expressão do gene *ATM*; (D) Expressão do gene *ATR*. Nota: (1) Os resultados foram expressos em valor mediano e intervalo interquartil. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança, de acordo com o Teste de Mann-Whitney.

Nas tabelas 25-29, os dados são apresentados em análises de cruzamentos múltiplos simultâneos. Verticalmente, os valores p correspondem às análises estatísticas das variáveis dos indivíduos pertencentes ao mesmo grupo de estudo. Em cada linha horizontal, os valores p dizem respeito à comparação da referida variável (ou categoria) entre os grupos SSHU e SS.

Nos cruzamentos das variáveis sexo, faixa etária e pressão arterial sistólica (PAS) dos grupos de pacientes, com e sem tratamento com HU, com os genes investigados, observou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas entre os cruzamentos da PAS com os genes *VEGF* (entre os membros do grupo SSHU ($p = 0,03$)), *ATM* (entre os membros de cada grupo:

SSHU ($p = 0,03$) e SS ($p = 0,02$) e *ATR* (entre os membros do grupo SS ($p < 0,01$)), conforme demonstrado pela tabela 25.

Ao analisarmos cada variável e/ou subcategorias, confrontado os valores de expressão gênica mensurados no grupo SS com os do grupo SSHU (vide linhas horizontais da tabela 25), pode-se concluir que o uso de HU foi capaz de induzir uma redução significativa na expressão gênica em, praticamente, todos os parâmetros.

Obs.: Para esta análise, a variável idade foi categorizada em faixas etárias para melhor avaliação.

Tabela 25 – Associação da expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* com variáveis demográficas de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	<i>HIF-1α</i>			<i>VEGF</i>			<i>ATM</i>			<i>ATR</i>		
	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a
<i>Sexo</i>												
Feminino	0,65 (0,6)	1,37 (0,9)	<0,01	0,33 (0,4)	0,67 (0,4)	<0,01	0,4 (0,3)	0,81 (0,4)	<0,01	0,35 (0,4)	0,68 (0,5)	<0,01
Masculino	0,62 (0,4)	1,29 (0,6)	<0,01	0,32 (0,3)	0,75 (0,4)	<0,01	0,38 (0,3)	0,77 (0,6)	<0,01	0,34 (0,3)	0,48 (0,5)	0,12
Valor p ^a	0,67	0,96	-	0,97	0,93	-	0,85	0,93	-	0,76	0,26	-
<i>Faixa etária (anos)</i>												
18 a 28	0,54 (0,6)	1,32 (1,2)	<0,01	0,22 (0,4)	0,66 (0,7)	<0,01	0,3 (0,3)	0,92 (0,8)	<0,01	0,34 (0,4)	0,54 (0,4)	0,08
29 a 39	0,7 (0,3)	1,69 (0,8)	<0,01	0,4 (0,3)	0,77 (0,3)	<0,01	0,45 (0,2)	0,81 (0,3)	<0,01	0,35 (0,3)	0,76 (0,4)	<0,01
≥40	0,63 (0,6)	1,14 (0,6)	<0,01	0,35 (0,3)	0,58 (0,3)	0,02	0,4 (0,5)	0,77 (0,4)	0,02	0,34 (0,3)	0,33 (0,7)	0,27
Valor p ^b	0,57	0,60	-	0,24	0,48	-	0,23	0,91	-	0,95	0,34	-
<i>PAS (mmHg)</i>												
>120	0,62 (0,6)	1,2 (0,9)	<0,01	0,21 (0,2)	0,57 (0,3)	<0,01	0,28 (0,2)	0,65 (0,3)	<0,01	0,26 (0,4)	0,45 (0,4)	0,07
≤120	0,63 (0,4)	1,48 (0,9)	<0,01	0,42 (0,4)	0,77 (0,5)	<0,01	0,42 (0,3)	0,95 (0,4)	<0,01	0,35 (0,3)	0,86 (0,5)	<0,01
Valor p ^a	0,43	0,16	-	0,03	0,13	-	0,03	0,02	-	0,12	<0,01	-

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de hidroxiuréia (HU); SS, pacientes falciformes sem uso de HU; PAS, pressão arterial sistólica. Nota: (1) Resultados expressos em valor mediano de 2^{- Δ Cq} e intervalo interquartil. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (3) ^a Teste de Mann-Whitney. (4) ^b Teste de Kruskal Wallis.

Com relação aos cruzamentos entre as complicações clínicas e intercorrências apresentadas pelos pacientes com AF, com e sem tratamento com HU, e a expressão gênica investigada, identificou-se que a única associação estatisticamente significativa foi no grupo SS (entre os membros do mesmo grupo), mais precisamente quanto ao gene *ATM* e problemas renais (valor $p = 0,048$). Os indivíduos que apresentaram problemas renais expressaram também níveis de *ATM* mais elevados, em relação aos indivíduos que declararam não terem alguma perturbação ou disfunção renal (TABELA 26).

Comparando a expressão gênica entre os grupos SS e SSHU, observamos que o grupo SSHU apresentou níveis significativamente mais baixos em quase todas as variáveis e parâmetros (vide linhas horizontais da tabela 26).

Tabela 26 - Associação da expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* com principais características clínicas e comorbidades de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	<i>HIF-1α</i>			<i>VEGF</i>			<i>ATM</i>			<i>ATR</i>		
	SSHU	SS	Valor p	SSHU	SS	Valor p	SSHU	SS	Valor p	SSHU	SS	Valor p
<i>Diabetes</i>												
Não	0,63 (0,4)	1,37 (0,9)	<0,01	0,33 (0,3)	0,68 (0,3)	<0,01	0,39 (0,3)	0,81 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,63 (0,5)	<0,01
Sim	-	1,01 (0,0)	-	-	0,68 (0,0)	-	-	0,63 (0,0)	-	-	0,31 (0,0)	-
Valor p	-	0,47	-	-	1,00	-	-	0,55	-	-	0,28	-
<i>HAS</i>												
Não	0,63 (0,4)	1,39 (0,9)	<0,01	0,32 (0,4)	0,66 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,84 (0,6)	<0,01	0,34 (0,4)	0,6 (0,5)	<0,01
Sim	0,64 (0,7)	1,06 (0,1)	0,4	0,39 (0,3)	0,73 (0,1)	0,04	0,45 (0,5)	0,7 (0,2)	0,53	0,37 (0,4)	0,53 (0,4)	0,53
Valor p	0,95	0,34	-	0,89	0,52	-	0,48	0,67	-	0,72	0,67	-
<i>AVC</i>												
Não	0,66 (0,4)	1,35 (0,9)	<0,01	0,33 (0,3)	0,68 (0,3)	<0,01	0,4 (0,3)	0,84 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,6 (0,5)	<0,01
Sim	0,45 (0,6)	1,47 (0,4)	0,1	0,19 (0,4)	0,5 (0,4)	0,37	0,32 (0,3)	0,59 (0,4)	0,31	0,25 (0,3)	0,43 (0,5)	0,69
Valor p	0,10	0,80	-	0,28	0,26	-	0,45	0,23	-	0,62	0,34	-
<i>Infecções recorrentes</i>												
Não	0,63 (0,4)	1,37 (0,9)	<0,01	0,35 (0,3)	0,73 (0,5)	<0,01	0,4 (0,3)	0,81 (0,7)	<0,01	0,34 (0,4)	0,63 (0,5)	<0,01
Sim	0,63 (0,7)	1,14 (0,9)	0,01	0,25 (0,4)	0,66 (0,2)	0,01	0,36 (0,3)	0,67 (0,3)	<0,01	0,34 (0,2)	0,43 (0,6)	0,38
Valor p	0,58	0,64	-	0,46	0,82	-	0,52	0,62	-	0,31	0,73	-
<i>Crise vaso-oclusiva</i>												
Não	0,62 (0,4)	1,35 (0,9)	<0,01	0,33 (0,4)	0,68 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,77 (0,4)	<0,01	0,34 (0,4)	0,6 (0,5)	<0,01
Sim	0,84 (0,6)	1,41 (0,3)	0,06	0,3 (0,4)	0,75 (0,9)	0,36	0,4 (0,2)	0,76 (0,7)	0,36	0,35 (0,3)	0,64 (0,9)	0,91
Valor p	0,15	0,93	-	0,37	0,93	-	0,49	0,67	-	0,63	1,00	-
<i>Colelitíase</i>												
Não	0,76 (0,6)	1,39 (0,9)	<0,01	0,24 (0,3)	0,68 (0,5)	<0,01	0,38 (0,4)	0,9 (0,5)	<0,01	0,33 (0,4)	0,6 (0,2)	0,01
Sim	0,58 (0,4)	1,31 (0,9)	<0,01	0,36 (0,4)	0,62 (0,4)	<0,01	0,41 (0,3)	0,72 (0,5)	<0,01	0,35 (0,4)	0,58 (0,5)	0,03
Valor p	0,07	0,86	-	0,61	0,40	-	0,97	0,12	-	0,70	0,76	-
<i>Necrose óssea</i>												
Não	0,62 (0,5)	1,39 (0,9)	<0,01	0,33 (0,4)	0,74 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,84 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,6 (0,5)	<0,01
Sim	0,7 (0,4)	1,11 (0,7)	0,05	0,33 (0,4)	0,47 (0,3)	0,52	0,44 (0,5)	0,62 (0,5)	0,3	0,36 (0,2)	0,51 (0,6)	0,64
Valor p	0,24	0,45	-	0,49	0,08	-	0,54	0,23	-	0,47	0,49	-
<i>Osteomielite</i>												
Não	0,63 (0,5)	1,39 (0,9)	<0,01	0,33 (0,4)	0,71 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,77 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,6 (0,5)	<0,01
Sim	0,71 (0,2)	1,11 (0,3)	0,2	0,57 (0,7)	0,39 (0,2)	0,8	0,48 (0,6)	0,67 (0,5)	0,8	0,63 (0,3)	0,52 (0,7)	1,0
Valor p	0,59	0,44	-	0,19	0,07	-	0,56	0,49	-	0,15	0,67	-
<i>Sequestro esplênico</i>												
Não	0,63 (0,4)	1,32 (0,9)	<0,01	0,33 (0,3)	0,67 (0,3)	<0,01	0,39 (0,3)	0,77 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,57 (0,5)	<0,01
Sim	1,03 (0,9)	1,39 (0,8)	0,041	0,52 (0,7)	1,1 (0,1)	0,048	0,71 (0,8)	1,21 (0,1)	0,06	0,57 (0,6)	0,69 (0,2)	0,15
Valor p	0,28	0,91	-	0,41	0,19	-	0,4	0,15	-	0,5	0,72	-

(continua)

Tabela 26 - Associação da expressão dos genes *HIF-1α*, *VEGF*, *ATM* e *ATR* com principais características clínicas e comorbidades de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	<i>HIF-1α</i>			<i>VEGF</i>			<i>ATM</i>			<i>ATR</i>		
	SSHU	SS	Valor p	SSHU	SS	Valor p	SSHU	SS	Valor p	SSHU	SS	Valor p
<i>Síndrome torácica aguda</i>												
Não	0,67 (0,7)	1,39 (0,7)	<0,01	0,33 (0,4)	0,75 (0,4)	<0,01	0,4 (0,3)	0,84 (0,5)	<0,01	0,35 (0,3)	0,6 (0,4)	<0,01
Sim	0,63 (0,3)	1,11 (1,0)	<0,01	0,32 (0,3)	0,53 (0,4)	0,01	0,3 (0,3)	0,66 (0,5)	0,02	0,33 (0,4)	0,57 (0,7)	0,13
Valor p	0,66	0,27	-	0,91	0,07	-	0,71	0,19	-	0,71	0,93	-
<i>Úlcera MMII</i>												
Não	0,65 (0,7)	1,44 (0,9)	<0,01	0,33 (0,3)	0,69 (0,3)	<0,01	0,4 (0,3)	0,9 (0,5)	<0,01	0,36 (0,3)	0,63 (0,5)	0,01
Sim	0,62 (0,2)	1,13 (0,8)	<0,01	0,33 (0,3)	0,52 (0,7)	0,03	0,35 (0,3)	0,6 (0,4)	<0,01	0,28 (0,3)	0,46 (0,5)	0,02
Valor p	0,73	0,26	-	0,76	0,56	-	0,15	0,13	-	0,16	0,72	-
<i>Problemas renais</i>												
Não	0,65 (0,5)	1,21 (0,9)	<0,01	0,32 (0,3)	0,62 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,72 (0,5)	<0,01	0,35 (0,3)	0,57 (0,5)	0,02
Sim	0,62 (0,5)	1,6 (0,6)	<0,01	0,37 (0,4)	0,78 (0,7)	<0,01	0,4 (0,4)	1,11 (0,6)	<0,01	0,34 (0,3)	0,67 (0,6)	<0,01
Valor p	0,98	0,20	-	0,85	0,12	-	0,62	0,048	-	0,35	0,37	-
<i>Cardiopatía</i>												
Não	0,65 (0,7)	1,48 (0,9)	<0,01	0,42 (0,5)	0,71 (0,4)	<0,01	0,43 (0,5)	0,9 (0,6)	<0,01	0,37 (0,4)	0,68 (0,4)	<0,01
Sim	0,62 (0,4)	1,12 (0,8)	0,01	0,29 (0,3)	0,67 (0,3)	<0,01	0,34 (0,3)	0,65 (0,4)	<0,01	0,34 (0,2)	0,37 (0,5)	0,56
Valor p	0,85	0,31	-	0,54	0,73	-	0,12	0,35	-	0,69	0,08	-
<i>Dispneia</i>												
Não	0,62 (0,4)	1,48 (0,7)	<0,01	0,24 (0,4)	0,71 (0,4)	<0,01	0,38 (0,3)	0,77 (0,5)	<0,01	0,34 (0,3)	0,48 (0,4)	0,02
Sim	0,66 (0,7)	1,21 (0,9)	<0,01	0,35 (0,3)	0,62 (0,3)	<0,01	0,4 (0,3)	0,81 (0,6)	<0,01	0,34 (0,5)	0,67 (0,6)	0,02
Valor p	0,41	0,51	-	0,88	0,98	-	0,50	0,81	-	0,81	0,34	-
<i>Astenia</i>												
Não	0,64 (0,4)	1,35 (0,9)	<0,01	0,32 (0,4)	0,71 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,77 (0,6)	<0,01	0,34 (0,3)	0,54 (0,5)	<0,01
Sim	0,55 (0,6)	1,34 (0,9)	0,03	0,38 (0,3)	0,62 (0,6)	0,02	0,49 (0,3)	0,92 (0,3)	0,01	0,39 (0,7)	0,93 (0,7)	0,21
Valor p	0,47	0,70	-	0,72	0,90	-	0,34	0,43	-	0,65	0,15	-
<i>Hepatomegalia</i>												
Não	0,66 (0,6)	1,29 (0,9)	<0,01	0,35 (0,4)	0,68 (0,4)	<0,01	0,42 (0,4)	0,77 (0,7)	<0,01	0,34 (0,4)	0,54 (0,5)	0,02
Sim	0,56 (0,5)	1,44 (0,8)	<0,01	0,25 (0,3)	0,72 (0,4)	<0,01	0,29 (0,3)	0,81 (0,3)	<0,01	0,34 (0,3)	0,79 (0,6)	<0,01
Valor p	0,61	0,22	-	0,22	0,26	-	0,06	0,79	-	0,96	0,24	-
<i>Crise convulsiva</i>												
Não	0,66 (0,5)	1,35 (0,9)	<0,01	0,33 (0,3)	0,68 (0,3)	<0,01	0,4 (0,3)	0,77 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,6 (0,5)	<0,01
Sim	0,45 (0,3)	-	-	0,24 (0,4)	-	-	0,29 (0,5)	-	-	0,33 (0,5)	-	-
Valor p	0,07	-	-	0,67	-	-	0,42	-	-	0,53	-	-

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de hidroxiuréia (HU); SS, pacientes falciformes sem uso de HU; HAS, hipertensão arterial sistólica; AVC, acidente vascular cerebral; úlcera MMII, úlcera em membros inferiores. Nota: (1) Resultados expressos em valor mediano de $2^{-\Delta Cq}$ e intervalo interquartil. (2) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (3) Teste de Mann-Whitney.

Quanto às variáveis alusivas à presença de crises álgicas, quantidade de episódios de dor e de internações hospitalares em tempo próximo ao do estudo (até 12 meses), nenhuma associação foi considerada significativa à 95% de confiança, quando comparados indivíduos dentro de um mesmo grupo (tanto SS como no SSHU) (TABELA 27).

A tabela 28 também não apresenta nenhuma significância entre os membros de mesmo grupo, quando avaliados a expressão gênica e fenótipo de gravidade de risco de morte. No entanto, ao analisarmos ambas as tabelas (27 e 28) na sua estrutura horizontal, observamos uma redução na expressão dos genes no grupo SSHU em comparação ao grupo SS, com algumas significâncias importantes.

Tabela 27 - Associação da expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* com variáveis relacionadas às crises âlgicas e internações hospitalares de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia

Variáveis	<i>HIF-1α</i>			<i>VEGF</i>			<i>ATM</i>			<i>ATR</i>		
	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a
<i>Crise âlgica</i>												
Não	0,66 (0,3)	1,48 (0,0)	0,67	0,31 (0,1)	0,94 (0,0)	0,67	0,29 (0,0)	0,9 (0,0)	0,67	0,29 (0,1)	0,87 (0,0)	0,67
Sim	0,63 (0,4)	1,32 (0,9)	<0,01	0,33 (0,4)	0,67 (0,3)	<0,01	0,39 (0,3)	0,77 (0,5)	<0,01	0,34 (0,4)	0,57 (0,5)	<0,01
Valor p ^a	0,85	0,81	-	0,88	0,28	-	0,45	0,77	-	0,51	0,28	-
<i>Quantidade de episódios de dor no último ano</i>												
≤2	0,56 (0,4)	1,69 (0,5)	<0,01	0,21 (0,4)	0,73 (0,2)	<0,01	0,29 (0,3)	0,9 (0,5)	<0,01	0,34 (0,3)	0,58 (0,5)	0,03
2 a 6	0,70 (0,7)	1,15(0,9)	0,01	0,38 (0,3)	0,72 (0,6)	<0,01	0,43 (0,4)	0,74 (0,7)	0,02	0,34 (0,3)	0,54 (0,5)	0,09
>6	0,63 (0,4)	1,27 (0,8)	<0,01	0,43 (0,4)	0,58 (0,3)	0,11	0,44 (0,3)	0,77 (0,3)	0,01	0,48 (0,4)	0,67 (0,5)	0,22
Valor p ^b	0,62	0,60	-	0,32	0,92	-	0,14	0,91	-	0,77	0,98	-
<i>Quantidade de internações no último ano</i>												
0	0,64 (0,4)	1,48 (0,8)	<0,01	0,32 (0,4)	0,66 (0,3)	<0,01	0,38 (0,3)	0,77 (0,4)	<0,01	0,34 (0,3)	0,48 (0,6)	<0,01
1	0,37 (0,9)	1,13 (1,1)	0,02	0,29 (0,3)	0,74 (0,7)	0,01	0,45 (0,4)	0,77 (0,8)	0,03	0,35 (0,6)	0,67 (0,4)	0,23
2	0,49 (0,4)	1,07 (0,4)	0,13	0,34 (0,5)	0,66 (0,2)	0,27	0,3 (0,1)	1,09 (1,0)	0,13	0,57 (0,4)	0,57 (0,1)	1,0
3	0,84 (0,0)	2,66 (0,0)	1,0	0,43 (0,0)	1,22 (0,0)	1,0	0,43 (0,0)	1,16 (0,0)	1,0	0,21 (0,0)	1,28 (0,0)	1,0
Valor p ^b	0,45	0,28	-	0,96	0,41	-	0,90	0,55	-	0,41	0,39	-

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de hidroxiuréia (HU); SS, pacientes falciformes sem uso de HU. Nota: (1) Resultados expressos em valor mediano de 2^{- $\Delta\Delta C_q$} e intervalo interquartil. (2) ^a Teste de Mann-Whitney. (3) ^b Teste de Kruskal Wallis.

Tabela 28 - Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia, versus expressão gênica

Classificação fenotípica de risco de morte	<i>HIF-1α</i>			<i>VEGF</i>			<i>ATM</i>			<i>ATR</i>		
	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a
Leve	0,65 (0,4)	1,37 (1,0)	<0,01	0,33 (0,4)	0,73 (0,4)	<0,01	0,4 (0,3)	0,72 (0,7)	<0,01	0,34 (0,4)	0,54 (0,4)	0,01
Intermediária	0,56 (0,8)	1,41 (0,8)	0,01	0,21 (0,3)	0,62 (0,3)	0,01	0,27 (0,4)	0,92 (0,4)	0,01	0,34 (0,3)	0,58 (0,7)	0,46
Grave	0,62 (0,6)	1,1 (1,1)	0,08	0,37 (0,3)	0,79 (0,5)	0,01	0,41 (0,5)	0,77 (0,2)	0,15	0,34 (0,4)	0,74 (0,3)	0,02
Valor p	0,96	0,80	-	0,48	0,55	-	0,48	0,90	-	0,99	0,81	-

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de hidroxiuréia (HU); SS, pacientes falciformes sem uso de HU. Nota: (1) Resultados expressos em valor mediano de 2^{- ΔC_q} e intervalo interquartil. (2) Teste de Kruskal Wallis. (3) Classificação fenotípica baseada na calculadora de gravidade da doença falciforme, disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>.

Ao se investigar a associação da concentração da Hb F nos grupos SSHU e SS com a expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*, foi utilizado novamente os dois critérios de escalas de concentração mais relevantes na literatura para esta variável, sendo a tabela 29 dividida em categorização I e II para a concentração de Hb F.

Entretanto, uma relação significativamente estatística foi observada apenas na associação do gene *HIF-1 α* e grupo SSHU (Categorização II, análise vertical) ($p = 0,03$), onde se observa uma elevação na expressão do gene entre indivíduos que apresentam concentração de Hb F no intervalo de 10,1 a 20%, em relação aos demais indivíduos do mesmo grupo. Igualmente, observa-se que, ao se confrontar a expressão dos genes dentro de um mesmo parâmetro (análise horizontal), os indivíduos do grupo SSHU exibem uma menor expressão gênica que indivíduos do grupo SS.

Tabela 29 – Associação da concentração de hemoglobina fetal de pacientes com anemia falciforme, em terapia ou não com hidroxiuréia, com os genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*

Hb F	<i>HIF-1α</i>			<i>VEGF</i>			<i>ATM</i>			<i>ATR</i>		
	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a	SSHU	SS	Valor p ^a
<i>Categorização I</i>												
<15%	0,65 (0,6)	1,39 (0,9)	<0,01	0,33 (0,4)	0,71 (0,4)	<0,01	0,39 (0,2)	0,84 (0,5)	<0,01	0,33 (0,4)	0,67 (0,5)	<0,01
15 a 20%	0,7 (0,7)	1,14 (0,8)	0,04	0,35 (0,4)	0,62 (0,3)	0,11	0,38 (0,4)	0,62 (0,6)	0,08	0,35 (0,3)	0,43 (0,7)	0,55
20,1 a 25%	0,43 (0,3)	-	-	0,28 (0,4)	-	-	0,27 (0,3)	-	-	0,64 (0,8)	-	-
>25%	0,58 (0,4)	-	-	0,2 (0,3)	-	-	0,42 (0,4)	-	-	0,27 (0,2)	-	-
Valor p	0,08	0,49	-	0,75	0,41	-	0,72	0,49	-	0,41	0,45	-
<i>Categorização II</i>												
<10%	0,59 (0,5)	1,54 (1,0)	<0,01	0,36 (0,4)	0,58 (0,5)	<0,01	0,31 (0,2)	0,84 (0,6)	<0,01	0,33 (0,3)	0,6 (0,5)	0,01
10,1 a 20%	0,7 (0,7)	1,31 (0,7)	<0,01	0,32 (0,4)	0,73 (0,3)	<0,01	0,39 (0,4)	0,72 (0,3)	<0,01	0,34 (0,3)	0,62 (0,5)	0,01
>20%	0,47 (0,4)	-	-	0,22 (0,3)	-	-	0,35 (0,3)	-	-	0,36 (0,5)	-	-
Valor p	0,03	0,69	-	0,48	0,66	-	0,81	0,81	-	0,64	0,89	-

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de hidroxiuréia (HU); SS, pacientes falciformes sem uso de HU; Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (1) Teste de significância: Kruskal Wallis. (2) Resultados expressos em valor mediano de 2^{-ACq} e intervalo interquartil. (3) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança.

6.3 Estudo de parâmetros e indicadores em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Com o intuito de melhor investigar a resposta do paciente ao uso de HU, perante os marcadores aqui investigados, bem como avaliar a correlação e influência do tratamento com a expressão de genes responsivos à hipóxia, o grupo SSHU fora estratificado, consoante as doses administradas em uso diário, em três subgrupos (grupos SSHU-0,5g (n= 13); SSHU-1g (n= 40) e SSHU- \geq 1,5g (n= 15), sendo, posteriormente, confrontados e analisados seus parâmetros clínicos e laboratoriais, como descritos a seguir.

A tabela 30 descreve os indivíduos em tratamento caracterizados e especificados conforme doses usuais do medicamento. Nela, observa-se a relação das características demográficas e parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes que fazem uso de HU particularizados por dose do fármaco, na qual se pode verificar que os indivíduos do grupo SSHU- \geq 1,5g apresentam uma elevação significativa dos parâmetros VCM ($p < 0,01$) e Hb F ($p < 0,01$) e uma redução dos níveis de LDH ($p = 0,03$) e AST ($p = 0,04$), quando comparados com indivíduos dos grupos SSHU-0,5g e SSHU-1g.

Tabela 30 – Caracterização demográfica e laboratorial de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Variáveis	SSHU			Valor p
	SSHU-0,5g	SSHU-1g	SSHU- \geq 1,5g	
<i>Sexo</i>				
Feminino	10 (76,92%)	22 (55%)	6 (40%)	0,15
Masculino	3 (23,08%)	18 (45%)	9 (60%)	
<i>Pressão arterial sistólica (PAS)</i>				
> 120 mmHg	3 (23,08%)	12 (30%)	4 (26,67%)	0,93
\leq 120 mmHg	10 (76,92%)	28 (70%)	11 (73,33%)	
<i>Faixa etária</i>				
18 a 28 anos	4 (30,77%)	19 (47,5%)	11 (73,33%)	0,08
29 a 39 anos	6 (46,15%)	13 (32,5%)	2 (13,33%)	
40 anos ou mais	3 (23,08%)	8 (20%)	2 (13,33%)	
<i>IMC (kg/m²)</i>	22,59 (16,86; 28,89)	21,40 (16,9; 33,65)	21,34 (19,46; 30,03)	0,73
<i>Tempo de uso de HU (anos)</i>				
0,5 a 5	5 (38,46%)	22 (55%)	6 (40%)	0,20
6 a 10	7 (53,85%)	15 (37,5%)	6 (40%)	
\geq 11	1 (7,69%)	3 (7,5%)	3 (20%)	

(continua)

Tabela 30 – Caracterização demográfica e laboratorial de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Variáveis	SSHU			Valor p
	SSHU-0,5g	SSHU-1g	SSHU-≥1,5g	
<i>Perfil hematológico</i>				
Eritrócitos (milhões/mm ³)	2,7 (0,92)	2,5 (0,6)	3,2 (1,38)	0,2
Hemoglobina (g/dL)	10,3 (2,93)	9,8 (1,95)	10,4 (1,7)	0,13
Hematócrito (%)	29 (9,7)	29,05 (6,35)	31,6 (7,13)	0,14
VCM (fL)	107,8 ^a (22,48)	111,67 ^a (16,03)	125,45 ^b (13,55)	<0,01
HCM (pg)	38,14 (8,49)	38,84 (5,7)	40 (8,26)	0,06
CHCM (g/dL)	35,24 (2)	34,35 (2,14)	35,51 (2,93)	0,17
Leucócitos (/mm ³)	10310 (4424,25)	8512,5 (3002,75)	7742 (4339,5)	0,39
Neutrófilos (/mm ³)	4948 (1882,25)	3874,5 (1919)	3321 (3586,25)	0,37
Plaquetas (/mm ³)	383000 (51925)	313350 (140250)	312900 (118050)	0,22
Reticulócitos (/mm ³)	180700 (203110)	207850 (80600)	187000 (121900)	0,97
Reticulócitos (%)	7,8 (8,95)	8,27 (3,78)	8,4 (7,23)	0,81
Hb F (%)	13,7 ^a (5,55)	15,2 ^a (9,53)	25,9 ^b (7,48)	<0,01
<i>Perfil bioquímico</i>				
Uréia (mg/dL)	17 (7)	18 (7)	18 (13,5)	0,51
Creatinina (mg/dL)	0,5 (0,16)	0,5 (0,3)	0,6 (0,2)	0,66
Lactato desidrogenase (U/L)	1039 ^a (387,25)	713,5 ^{ab} (356,25)	619 ^b (232,25)	0,03
Ácido úrico (mg/dL)	3,85 (0,98)	4,5 (1,78)	4,75 (1,85)	0,48
Bilirrubina total (mg/dL)	2,29 (2,54)	2,39 (1,59)	2,29 (1,56)	0,22
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,47 (0,18)	0,36 (0,3)	0,27 (0,16)	0,69
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,82 (2,36)	1,97 (1,27)	1,89 (1,56)	0,44
Aspartato aminotransferase (U/L)	49 ^a (39,5)	37,5 ^{ab} (16,25)	29 ^b (20)	0,04
Alanina aminotransferase (U/L)	33 (18,75)	26 (30,25)	23 (24,25)	0,51
Fosfatase alcalina (U/L)	236,5 (203,25)	205 (127,25)	212 (102)	0,53
Gama glutamiltransferase (U/L)	35 (148,25)	39 (49,5)	56 (60,5)	0,56
Ferro (µg/dL)	116,5 (108,5)	124 (57,25)	111 (65)	0,61
Ferritina (ng/mL)	330 (263,03)	363,1 (576,05)	355,1 (829,28)	0,45

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU: pacientes falciformes em uso de hidroxiuréia (HU) (0,5g, n=13; 1g, n=40; ≥1,5g, n=15); IMC, índice de massa corporal; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Os valores de sexo, PAS, faixa etária e tempo de uso de HU são apresentados em número de casos e percentual. (3) Os valores de IMC representam as medianas (mínimo; máximo). (4) Os dados laboratoriais estão expressos em mediana e intervalo interquartil. (5) Os testes aplicados foram os de Exato de Fisher, Mann-Whitney (IMC), Kruskal Wallis (perfil laboratorial). (6) As letras em algumas caselas referem-se ao resultado do teste de comparações múltiplas de Dunn. Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

Nas tabelas 31 e 32, características e principais intercorrências clínicas dos pacientes, classificados em grupos segundo dosagem do medicamento, são apresentadas e contrapostas com a finalidade de se investigar possíveis efeitos benéficos e diferenciais em decorrência do uso de posologias distintas. Contudo, não foram identificadas evidências pertinentes que propusessem associação significativa entre as variáveis expostas nas referidas tabelas com a dosagem de HU, uma vez que o valor p resultante dos testes foram todos maiores que o nível de significância adotado no estudo (0,05).

Tabela 31 – Frequência das complicações clínicas e comorbidades de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Variáveis	SSHU			Valor p
	SSHU-0,5g	SSHU-1g	SSHU-≥1,5g	
AVC	0 (0%)	8 (20%)	3 (23,08%)	0,23 ^a
Crise vaso-oclusiva	3 (23,08%)	5 (12,5%)	2 (15,38%)	0,49 ^a
Colelitíase	6 (46,15%)	25 (62,5%)	7 (53,85%)	0,49 ^b
Infecções recorrentes	4 (30,77%)	10 (25%)	7 (53,85%)	0,17 ^a
Necrose óssea	1 (7,69%)	8 (20%)	1 (7,69%)	0,44 ^a
Osteomielite	1 (7,69%)	2 (5%)	0 (0%)	1 ^a
Sequestro esplênico	2 (15,38%)	8 (20%)	5 (33,33%)	0,60 ^a
Síndrome torácica aguda	6 (46,15%)	21 (52,5%)	4 (30,77%)	0,40 ^a
Úlcera MMII	2 (15,38%)	17 (42,5%)	3 (23,08%)	0,16 ^a
Problemas renais	3 (23,08%)	14 (35%)	4 (30,77%)	0,82 ^a
Cardiopatía	3 (23,08%)	23 (57,5%)	8 (61,54%)	0,08 ^a
Dispneia	6 (46,15%)	12 (30%)	7 (53,85%)	0,24 ^b
Astenia	1 (7,69%)	6 (15%)	1 (7,69%)	0,77 ^a
Hepatomegalia	4 (30,77%)	18 (45%)	5 (38,46%)	0,69 ^a
Crise convulsiva	1 (7,69%)	5 (12,5%)	3 (23,08%)	0,60 ^a
HAS	1 (7,69%)	4 (10%)	3 (23,08%)	0,56 ^a

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; ≥1,5g, n=15); AVC, acidente vascular cerebral; úlcera MMII, úlcera em membros inferiores; HAS, hipertensão arterial sistólica. Nota: (1) ^a Teste Exato de Fisher. (2) ^b Teste Qui-Quadrado. (3) Resultados expressos em número de casos e percentual.

Tabela 32 - Frequência das variáveis relacionadas às crises álgicas e internações hospitalares de pacientes falciformes, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Variáveis	SSHU			Valor p
	SSHU-0,5g	SSHU-1g	SSHU-≥1,5g	
<i>Crise álgica</i>				
Não	1 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)	0,64
Sim	12 (92,31%)	40 (100%)	14 (93,33%)	
Não consta	--	--	1 (6,67%)	
<i>Quantidade de episódios de dor no último ano</i>				
≤ 2	8 (61,54%)	22 (55%)	5 (33,33%)	0,88
3 a 6	4 (30,77%)	14 (35%)	7 (46,66%)	
> 6	1 (7,69%)	4 (10%)	1 (6,66%)	
Não consta	--	--	2 (13,33%)	
<i>Quantidade de internações no último ano</i>				
0	11 (84,62%)	32 (80,0%)	7 (46,66%)	0,20
1	2 (15,38%)	5 (12,5%)	3 (20,0%)	
2	0 (0%)	2 (5,0%)	2 (13,33%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,66%)	
Não consta	--	1 (2,5%)	2 (13,33%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; ≥1,5g, n=15). Nota: (1) Teste de significância: Exato de Fisher. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual.

Quanto à avaliação do risco de morte em 5 anos, embora nenhuma relação estatisticamente significativa tenha sido identificada, observa-se que mais de 60% dos indivíduos pertencentes a cada grupo foi classificado como sendo de fenótipo leve da doença. Em condição de grave risco, estão cerca de 23,08% dos pacientes tanto do grupo SSHU-0,5g como do grupo SSHU-≥1,5g, e 17,5% dos integrantes do grupo SSHU-1g (TABELA 33).

Tabela 33 – Classificação fenotípica de risco de morte de pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Classificação fenotípica de risco de morte	SSHU (n=66)			Valor p
	SSHU-0,5g	SSHU-1g	SSHU-≥1,5g	
Leve	9 (69,23%)	26 (65%)	8 (61,54%)	0,95
Intermediária	1 (7,69%)	7 (17,5%)	2 (15,38%)	
Grave	3 (23,08%)	7 (17,5%)	3 (23,08%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; ≥1,5g, n=13). Nota: (1) Teste de significância: Exato de Fisher. (2) Resultados expressos em número de casos e percentual. (3) Classificação fenotípica baseada na calculadora de gravidade da doença falciforme, disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>.

Considerando os mesmos critérios aplicados anteriormente, a Hb F também foi avaliada utilizando-se de 2 sistemas distintos de categorização, um com 4 parâmetros e outro com 3 parâmetros (TABELA 34). Em ambos os sistemas de categorização, pode-se observar que os cruzamentos entre os níveis de Hb F e a estratificação dos grupos pela posologia apresentaram associações de grande relevância, com valor p de $< 0,01$.

Tabela 34 – Concentração de hemoglobina fetal de pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

Hb F	SSHU			Valor p
	SSHU-0,5g	SSHU-1g	SSHU- \geq 1,5g	
<i>Categorização I</i>				
<15%	8 (61,54%)	19 (47,5%)	0 (0%)	<0,01
15 a 20%	5 (38,46%)	14 (35%)	2 (13,33%)	
20,1 a 25%	0 (0%)	4 (10%)	5 (30,77%)	
>25%	0 (0%)	3 (7,5%)	8 (53,85%)	
<i>Categorização II</i>				
<10%	4 (30,77%)	12 (30%)	0 (0%)	<0,01
10,1 a 20%	9 (69,23%)	21 (52,5%)	2 (13,33%)	
>20%	0 (0%)	7 (17,5%)	13 (86,67%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; \geq 1,5g, n=15); Hb F, hemoglobina fetal. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Teste Exato de Fisher. (3) Resultados expressos em número de casos e percentual.

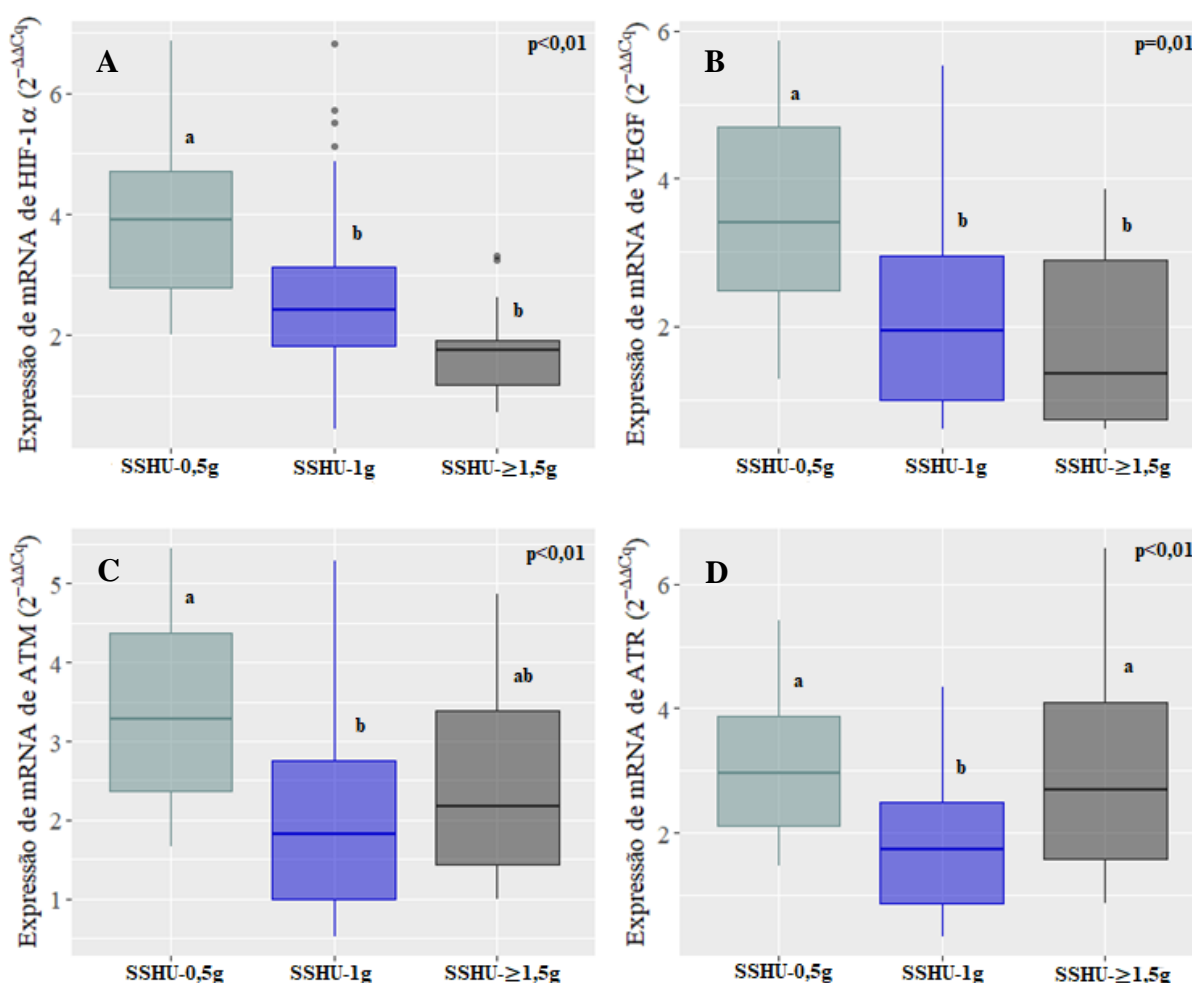
6.3.1 Análises da expressão de genes relacionados à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia

O estudo da expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* em pacientes falciformes também levou em consideração aqueles que estavam sob tratamento com a HU em dosagens distintas de posologia diária. Dessa forma, foi avaliada a expressão gênica dos pacientes, distribuídos nos grupos SSHU-0,5g, SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g, para análise da influência da dose do medicamento sobre a expressão dos referidos genes. Oportunamente, esses grupos foram comparados aos demais grupos do estudo (AA e SS) para ampliar o universo da avaliação gênica na doença.

Na figura 23, é apresentado o cruzamento entre a expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) e os grupos classificados de acordo com a dose de medicamento. Da análise da referida figura, pode-se concluir que:

- A expressão do gene *HIF-1 α* de quem toma HU na dose 0,5g (3,92, IIQ = 2,05) é significativamente maior ($p < 0,01$) do que quem toma o medicamento nas doses 1g (2,43, IIQ = 1,52) e $\geq 1,5g$ (1,75, IIQ = 1,11), ou seja, quanto maior à dose de HU, menor a expressão de *HIF1 α* (FIGURA 23 A).
- O gene *VEGF* de quem toma HU na dose de 0,5g (3,4, IIQ= 2,83) está substancialmente superexpresso em relação a quem toma nas doses 1g (1,93, IIQ = 1,98) e $\geq 1,5g$ (1,36, IIQ = 1,36), com valor $p = 0,01$ (FIGURA 23 B). Da mesma forma que no item anterior, doses mais elevadas de HU estão relacionadas a uma menor expressão gênica.
- A expressão gênica de *ATM* dos indivíduos que usam HU na dose de 1g (1,82, IIQ = 1,84) é consideravelmente reduzida em comparação aos indivíduos de 0,5g (3,28, IIQ = 2,08) ($p < 0,01$). Porém, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos SSHU-1g e SSHU- $\geq 1,5g$ (2,18, IIQ = 2,17), ou entre os grupos SSHU-0,5g e SSHU- $\geq 1,5g$ (FIGURA 23 C).
- Quanto ao gene *ATR* de quem toma HU na dose de 1g (1,73, IIQ = 1,66), é expressamente reduzida sua concentração ($p < 0,01$) em relação ao demais pacientes que fazem uso de HU em outras dosagens, a saber: grupo SSHU-0,5g (2,96, IIQ = 1,83) e grupo SSHU- $\geq 1,5g$ (2,7, IIQ = 2,77) (FIGURA 23 D).

Figura 23 - Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia



Fonte: Dados da pesquisa.

SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; $\geq 1,5g$, n=15); (A) Expressão do gene *HIF-1 α* ; (B) Expressão do gene *VEGF*; (C) Expressão do gene *ATM*; (D) Expressão do gene *ATR*. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Resultados expressos em mediana. (3) Os testes aplicados foram os de Kruskal Wallis e pós teste de comparações múltiplas de Dunn. (4) Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

Quanto à comparação dos grupos em tratamento com o grupo sem tratamento com HU ($2^{-\Delta Cq}$), a figura 24 descreve as análises das expressões dos genes de estudo, nas quais, conclui-se:

- Os grupos SSHU-1g (0,62; IIQ = 0,37) e SSHU $\geq 1,5g$ (0,44; IIQ = 0,28) apresentam redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$) da expressão do gene *HIF-1 α* , em relação aos grupos SSHU-0,5g (0,99; IIQ = 0,52) e SS (1,35; IIQ = 0,87) (FIGURA 24 A).

Não houve diferença significativa entre a expressão dos grupos SSHU-0,5g e SS, ou entre os grupos SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g.

- Ao comparar os grupos em tratamento com o grupo sem tratamento, observa-se uma redução da expressão de *VEGF* ($p = 0,01$) nos grupos SSHU-1g (0,28; IIQ = 0,29) e SSHU- \geq 1,5g (0,20; IIQ = 0,35), em relação ao grupo SSHU-0,5g (0,50; IIQ = 0,42) e grupo SS (0,68; IIQ = 0,32) (FIGURA 24 B).

Nenhuma diferença significativa entre a expressão dos grupos SSHU-0,5g e SS, ou entre os grupos SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g, foi observada.

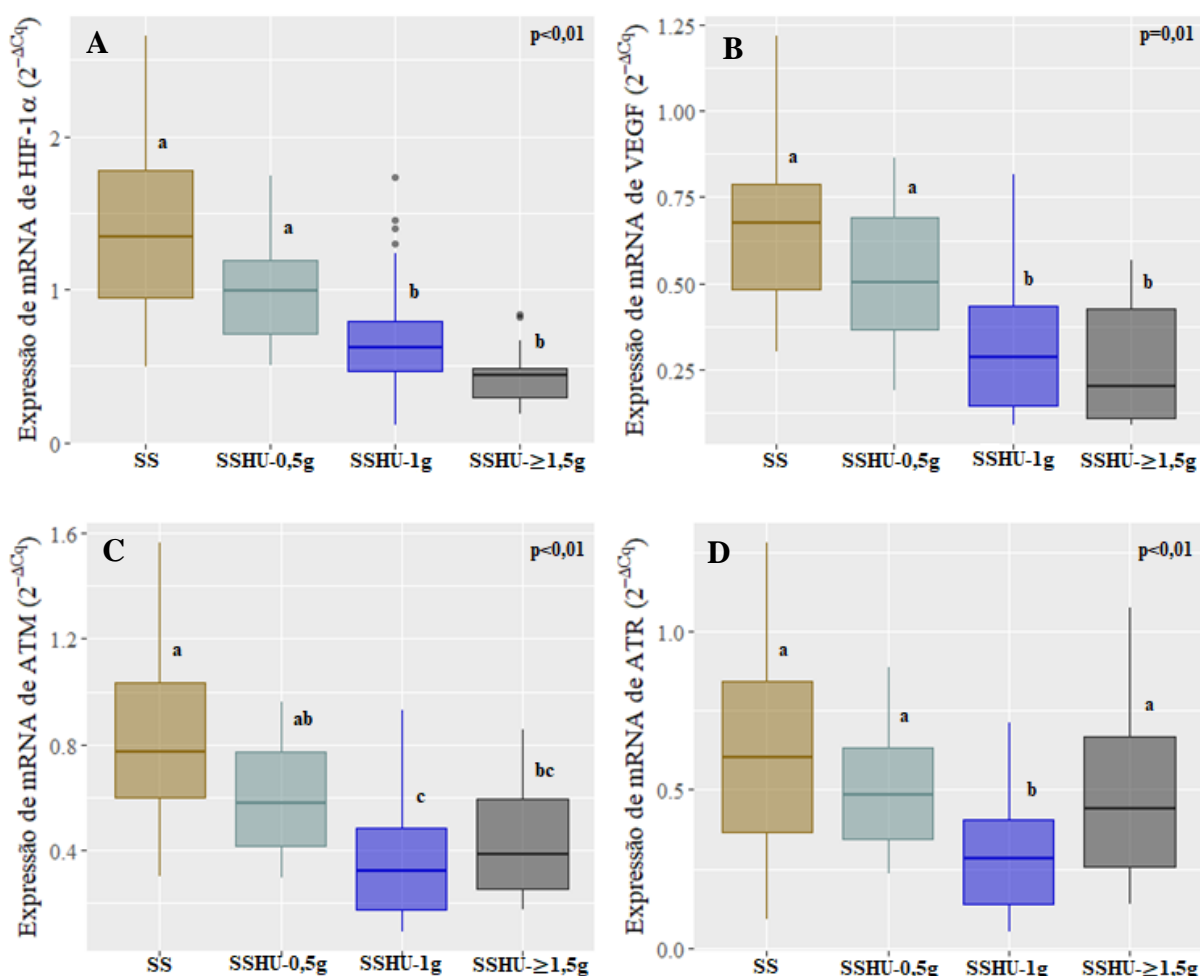
- A comparação $2^{-\Delta Cq}$ entre os grupos com e sem tratamento evidencia uma redução significativa da expressão de *ATM* nos grupos SSHU-1g (0,32; IIQ = 0,32) e SSHU- \geq 1,5g (0,38; IIQ = 0,38), em referência ao grupo SS (0,77; IIQ = 0,5). Além disso, observa-se uma apreciável diferença na expressão do gene no grupo SSHU-1g, quando comparado ao grupo SSHU-0,5g (0,58; IIQ = 0,37) (FIGURA 24 C).

Interessantemente, nenhuma expressiva diferença foi observada entre os grupos SSHU- \geq 1,5g e SSHU-0,5g. Não houve diferença significativa entre a expressão dos grupos SSHU-0,5g e SS.

- Quanto ao gene *ATR*, observou-se uma redução significativa ($p < 0,01$) da expressão do gene no grupo SSHU-1g (0,28; IIQ = 0,27), em relação aos demais grupos do estudo (SSHU-0,5g (0,48; IIQ = 0,30); SSHU- \geq 1,5g (0,44; IIQ = 0,45) e SS (0,6; IIQ = 0,5)) (FIGURA 24 D).

Curiosamente, nenhuma diferença relevante foi encontrada entre os grupos SSHU- \geq 1,5g, SSHU-0,5g e SS.

Figura 24 - Expressão gênica em resposta à hipóxia em pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia e sem tratamento



Fonte: Dados da pesquisa.

SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU) (n=29); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; $\geq 1,5g$, n=15); (A) Expressão do gene *HIF-1α*; (B) Expressão do gene *VEGF*; (C) Expressão do gene *ATM*; (D) Expressão do gene *ATR*. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Teste de Kruskal Wallis e pós teste de comparações múltiplas de Dunn. (3) Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. (4) Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

Para finalizar, a figura 25 apresenta todos os grupos estudados, lado a lado, para se verificar a relação entre eles, quanto à expressão dos genes em foco. Ao confrontar todos os grupos juntos, observa-se que:

- A mensuração do gene *HIF-1α* nos grupos SS (1,35; IIQ = 0,87), SSHU-0,5g (0,99; IIQ = 0,52) e SSHU-1g (0,62; IIQ = 0,37) encontra-se superexpressa em relação ao grupo controle AA (0,26; IIQ = 23). Os grupos SSHU-1g e SSHU- $\geq 1,5g$ (0,44; IIQ = 0,28) demonstraram redução significativa na expressão do gene, quando comparados ao grupo SS. O grupo SSHU- $\geq 1,5g$ apresentou expressiva redução de

HIF-1 α , em relação ao grupo SSHU-0,5g, e valores similares ao grupo AA (FIGURA 25 A).

- Na análise da expressão do gene *VEGF*, os grupos SS (0,68; IIQ = 0,32), SSHU-0,5g (0,50; IIQ = 0,42) e SSHU-1g (0,28; IIQ = 0,29) apresentam-se superexpressos em relação ao grupo AA (0,15; IIQ = 0,15). Os grupos SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g (0,20; IIQ = 0,35) demonstraram expressiva redução do gene em comparação ao grupo SS (FIGURA 25 B).

Não houve diferença significativa entre os grupos em tratamento, e entre o grupo SSHU- \geq 1,5g e AA.

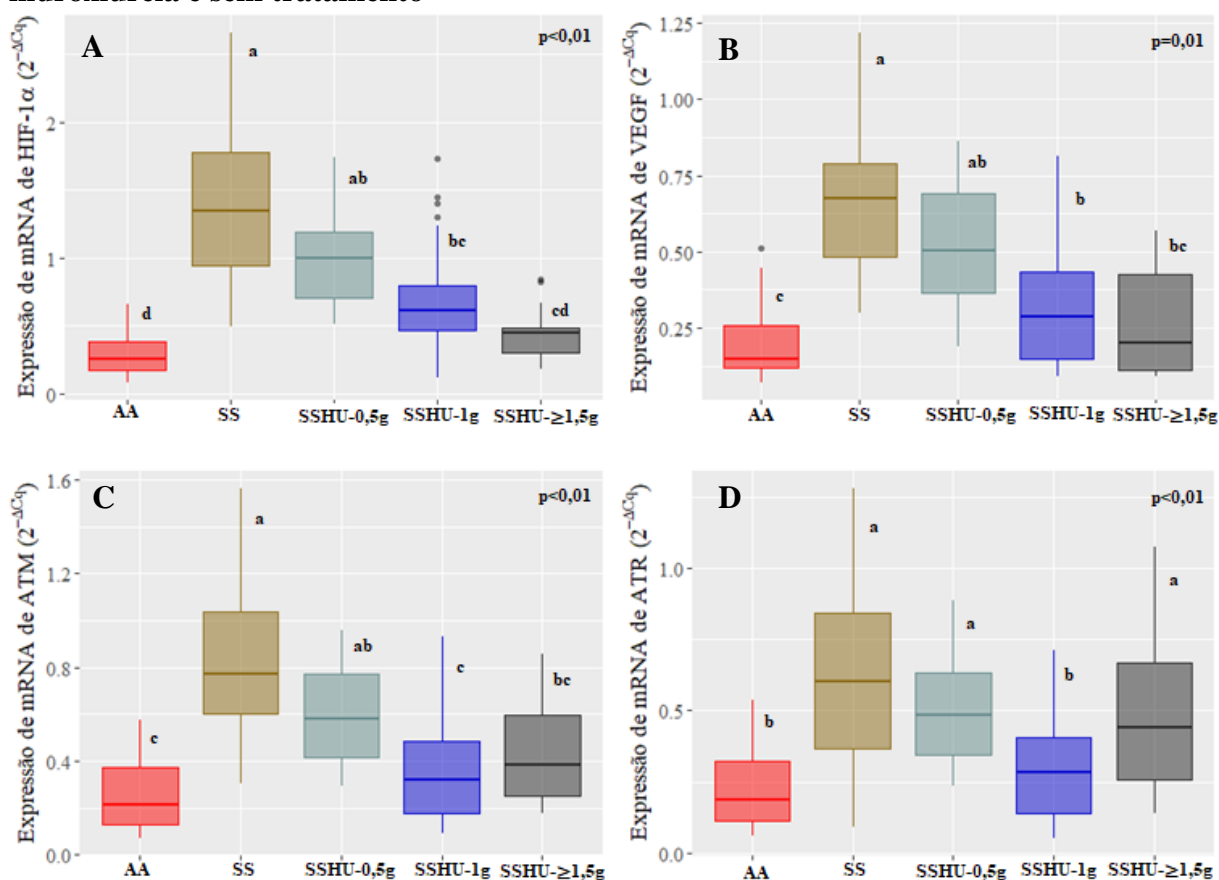
- Quanto ao gene *ATM*, também foi identificado aumento significativo em sua expressão nos grupos SS (0,77; IIQ = 0,5) e SSHU-0,5g (0,58; IIQ = 0,37), em relação ao grupo AA (0,21; IIQ = 0,25). Indivíduos que tomam HU nas doses de 1g (0,32; IIQ = 0,32) e \geq 1,5g (0,38; IIQ = 0,38) demonstraram uma expressiva redução gênica em comparação aos indivíduos sem HU, assim como os indivíduos do grupo SSHU-1g também exibiram considerável redução do gene *ATM*, quando comparados aos do grupo SSHU-0,5g (FIGURA 25 C).

Mais uma vez, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos SS e SSHU-0,5g, e entre os grupos AA, SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g.

- O gene *ATR* demonstrou estar superexpresso nos grupos SS (0,6; IIQ = 0,5), SSHU-0,5g (0,48; IIQ = 0,30) e SSHU- \geq 1,5g (0,44; IIQ = 0,5), em relação ao grupo AA (0,19; IIQ = 0,21). O grupo SSHU-1g (0,28; IIQ = 0,27) exibiu redução expressiva de *ATR*, quando confrontado com demais grupos de pacientes (FIGURA 25 D).

Os grupos AA e SSHU-1g, bem como os grupos SS, SSHU-0,5g e SSHU- \geq 1,5g não apresentaram diferença significativa na expressão gênica entre si.

Figura 25 - Expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* em indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme, estratificados segundo dose do medicamento hidroxiuréia e sem tratamento



Fonte: Dados da pesquisa.

AA, indivíduos saudáveis (grupo controle, n=73); SS, pacientes falciformes sem uso de hidroxiuréia (HU) (n=29); SSHU, pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=40; $\geq 1,5g$, n=15); (A) Expressão do gene *HIF-1 α* ; (B) Expressão do gene *VEGF*; (C) Expressão do gene *ATM*; (D) Expressão do gene *ATR*. Nota: (1) Os valores p em negrito foram significativos, com 95% de confiança. (2) Teste de Kruskal Wallis e pós teste de comparações múltiplas de Dunn. (3) Resultados expressos em mediana. (4) Letras diferentes significam diferença estatística entre grupos.

6.4 Análises da correlação entre os níveis de expressão de genes relacionados aos mecanismos de hipóxia e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme

Ao se estudar duas ou mais variáveis, faz-se de grande pertinência buscar desvendar se elas têm algum relacionamento interdependente entre si, isto é, se de alguma forma, valores altos (ou baixos) de uma das variáveis implicam em valores altos (ou baixos) da outra variável. Neste contexto, essa relação pode indicar que uma variável pode ter uma influência direta/indireta sobre a outra, hipotetizando uma correlação estreita, ou mesmo dependente.

Quando se trata de correlação concordante, podemos ter dois tipos de resultados esperados: correlação positiva ou correlação negativa. Quando a correlação entre as variáveis é positiva, o comportamento de ambas será o mesmo, assim quando uma aumenta a outra aumenta, e quando uma delas diminui a outra também diminui. Agora, quando a correlação é

negativa, as variáveis apresentam comportamento inverso, ou seja, quando uma das variáveis aumenta a outra diminui, e vice-versa.

No tocante aos cruzamentos dos parâmetros clínico-laboratoriais com os genes de hipóxia, observa-se a presença de várias correlações significativas. Enquanto a tabela 35 apresenta os cruzamentos entre as variáveis hematológicas e bioquímicas com a expressão gênica, a tabela 36 expõe o comportamento (tipo) das correlações que foram significativas por esta investigação.

Tabela 35 – Correlação entre genes responsivos à hipóxia e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme

Variáveis	Coeficiente de correlação – “r”			
	<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF</i>	<i>ATM</i>	<i>ATR</i>
Eritrócitos (milhões/mm ³)	- 0,15	- 0,14	0,03	- 0,02
Hemoglobina (g/dL)	- 0,32**	- 0,28**	- 0,17	- 0,19
Hematócrito (%)	- 0,32**	- 0,30**	- 0,17	- 0,16
VCM (fL)	- 0,29**	- 0,28**	- 0,29**	- 0,14
HCM (pg)	- 0,41**	- 0,35**	- 0,43**	- 0,27**
CHCM (g/dL)	- 0,17	- 0,12	- 0,08	- 0,04
Leucócitos (/mm ³)	0,43**	0,37**	0,30**	0,26*
Neutrófilos (/mm ³)	0,40**	0,42**	0,34**	0,31**
Plaquetas (/mm ³)	0,33**	0,34**	0,33**	0,20*
Reticulócitos (/mm ³)	0,34**	0,26**	0,34**	0,38**
Reticulócitos (%)	0,23*	0,15	0,18	0,31**
Hemoglobina F (%)	- 0,39**	- 0,33**	- 0,26*	- 0,14
Hemoglobina S (%)	0,42**	0,32**	0,26*	0,15
Uréia (mg/dL)	0,14	0,06	0,09	0,06
Creatinina (mg/dL)	0,16	0,04	0,09	0,10
Lactato desidrogenase (U/L)	0,25*	0,24*	0,22*	0,11
Ácido úrico (mg/dL)	0,20	0,24*	0,19	0,11
Bilirrubina total (mg/dL)	0,24*	0,19	0,12	0,09
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,30**	0,18	0,23*	0,15
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,19	0,16	0,08	0,06
Aspartato aminotransferase (U/L)	0,17	0,11	0,06	0,10
Alanina aminotransferase (U/L)	0,24*	0,08	0,14	0,25*
Fosfatase alcalina (U/L)	0,11	0,19	0,09	0,04
Gama glutamiltransferase (U/L)	- 0,09	0,17	0,04	0,11
Ferro (μ g/dL)	0,49**	0,47**	0,53**	0,45**
Ferritina (ng/mL)	- 0,06	0,05	- 0,09	- 0,02

Fonte: Dados da pesquisa.

VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média. Nota: (*) significante a 95% de confiança; (**) significante a 99% de confiança. Teste de significância aplicado: Correlação de Pearson.

Tabela 36 – Classificação das correlações significativas entre a expressão gênica e parâmetros clínico-laboratoriais de pacientes com anemia falciforme

Variáveis	Classificação de correlação			
	<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF</i>	<i>ATM</i>	<i>ATR</i>
Hemoglobina (g/dL)	Negativa	Negativa	-	-
Hematócrito (%)	Negativa	Negativa	-	-
VCM (fL)	Negativa	Negativa	Negativa	-
HCM (pg)	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
Leucócitos (/mm ³)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Neutrófilos (/mm ³)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Plaquetas (/mm ³)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Reticulócitos (/mm ³)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Reticulócitos (%)	Positiva	-	-	Positiva
Hemoglobina F (%)	Negativa	Negativa	Negativa	-
Hemoglobina S (%)	Positiva	Positiva	Positiva	-
Lactato desidrogenase (U/L)	Positiva	Positiva	Positiva	-
Ácido úrico (mg/dL)	-	Positiva	-	-
Bilirrubina total (mg/dL)	Positiva	-	-	-
Bilirrubina direta (mg/dL)	Positiva	-	Positiva	-
Alanina aminotransferase (U/L)	Positiva	-	-	Positiva
Ferro (μ g/dL)	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

Fonte: Dados da pesquisa.

VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média. Nota (1) Classificação obtida a partir da Correlação de Pearson.

As figuras de 26 a 29 exibem as Correlações de Pearson entre os níveis de expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*, respectivamente, e as variáveis clínico-laboratoriais, cujas análises foram significantes.

Figura 26 - Análise de correlação dos níveis de expressão do gene *HIF-1α* e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme

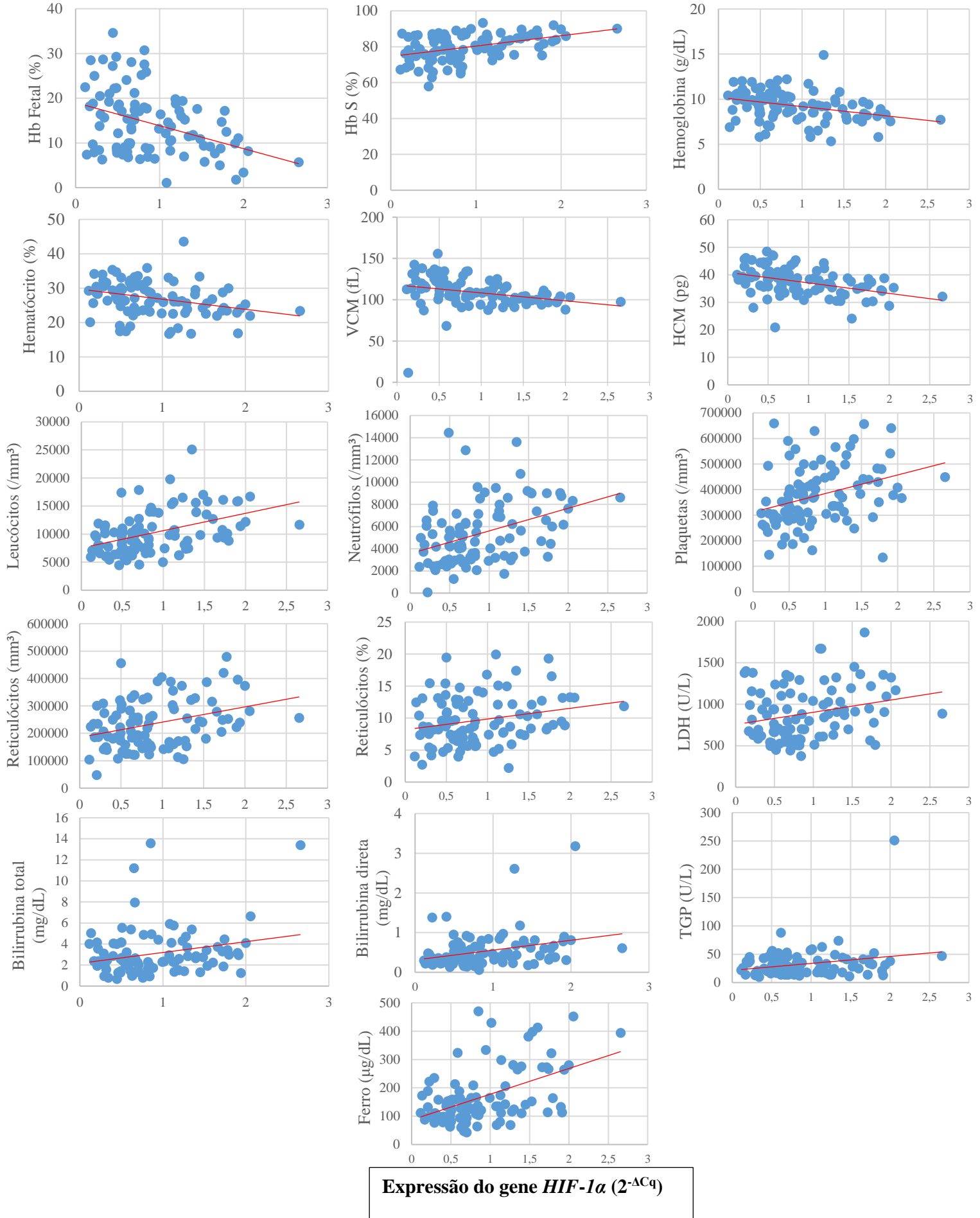


Figura 27 - Análise de correlação dos níveis de expressão do gene *VEGF* e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme

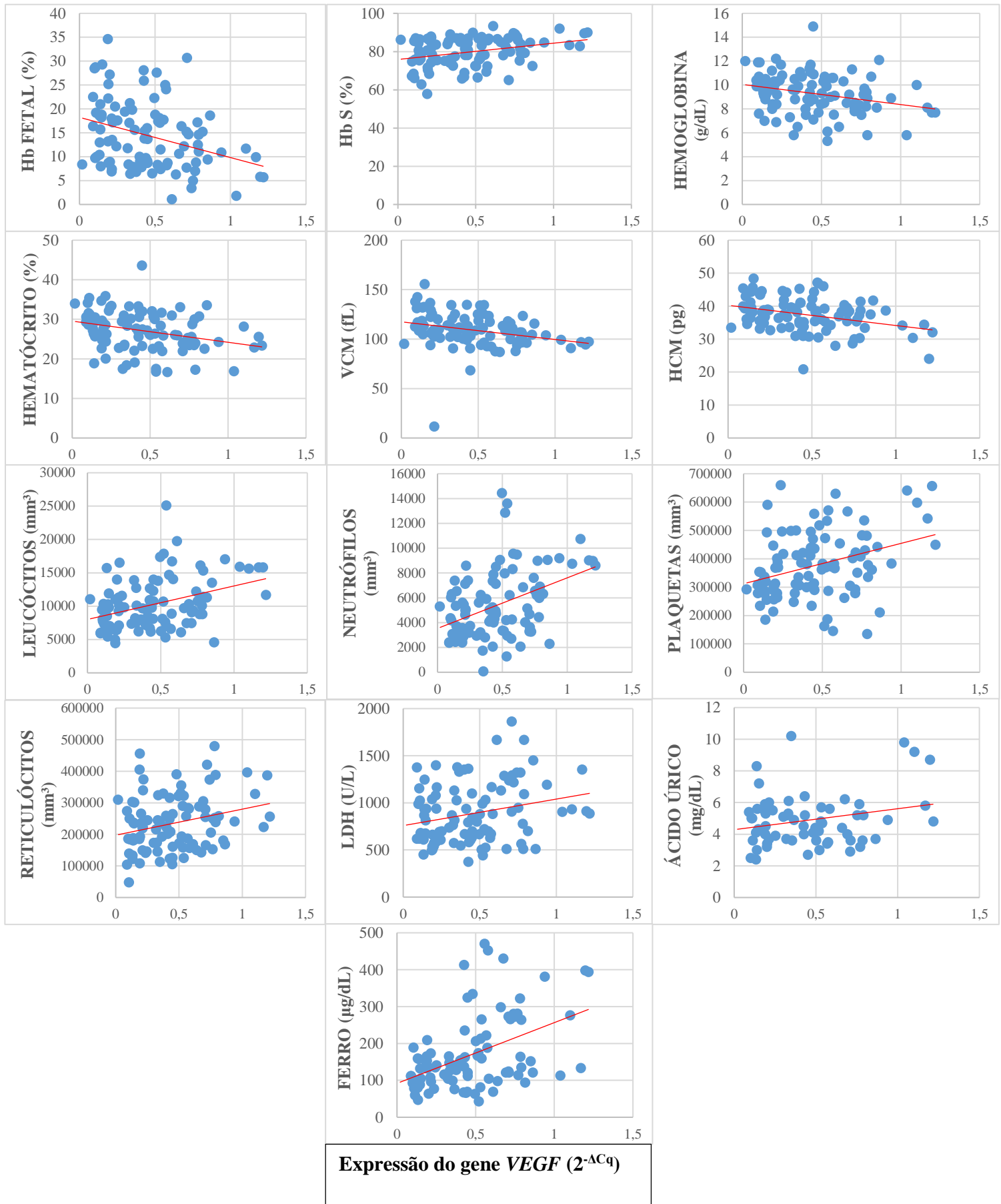
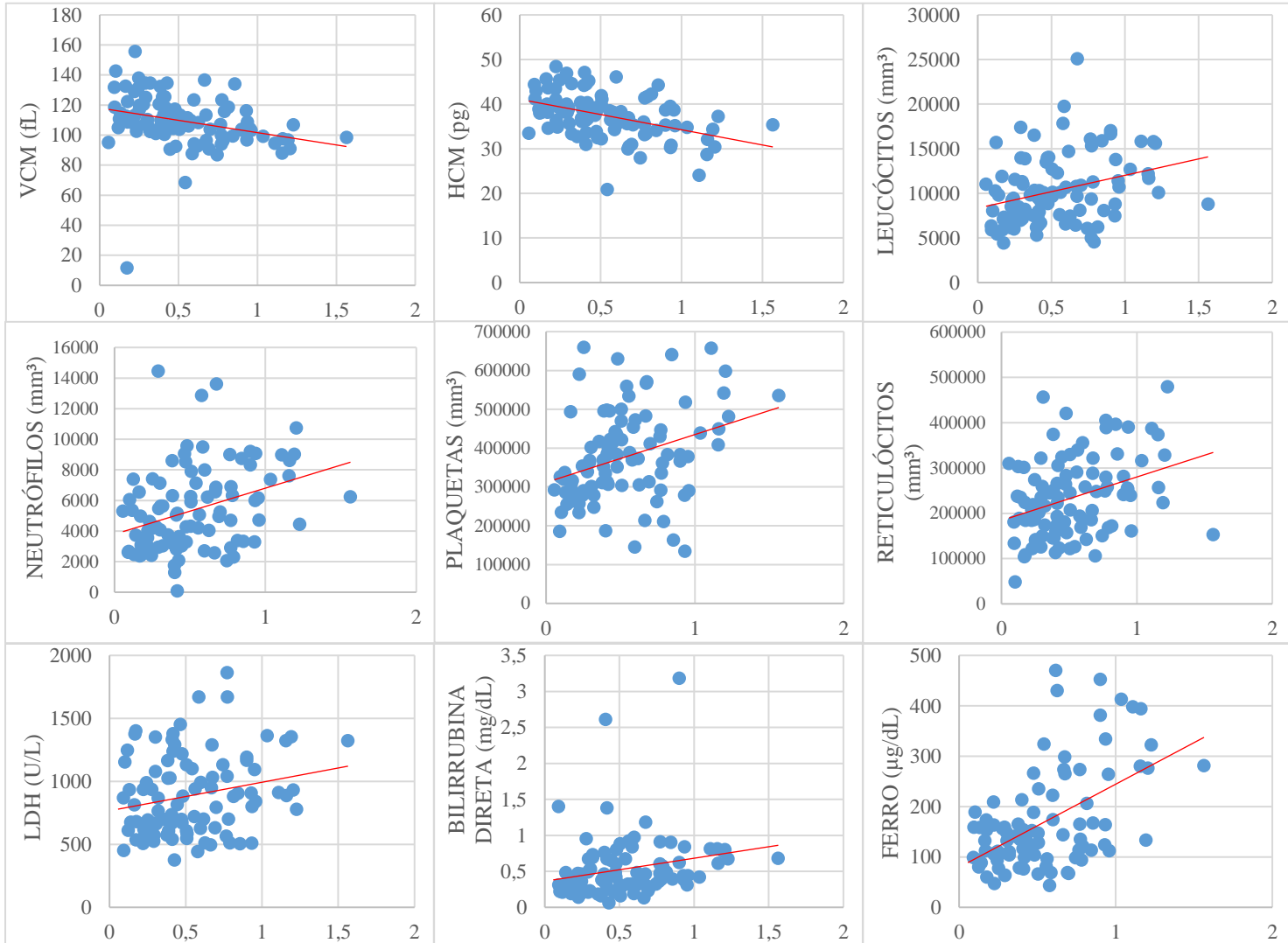
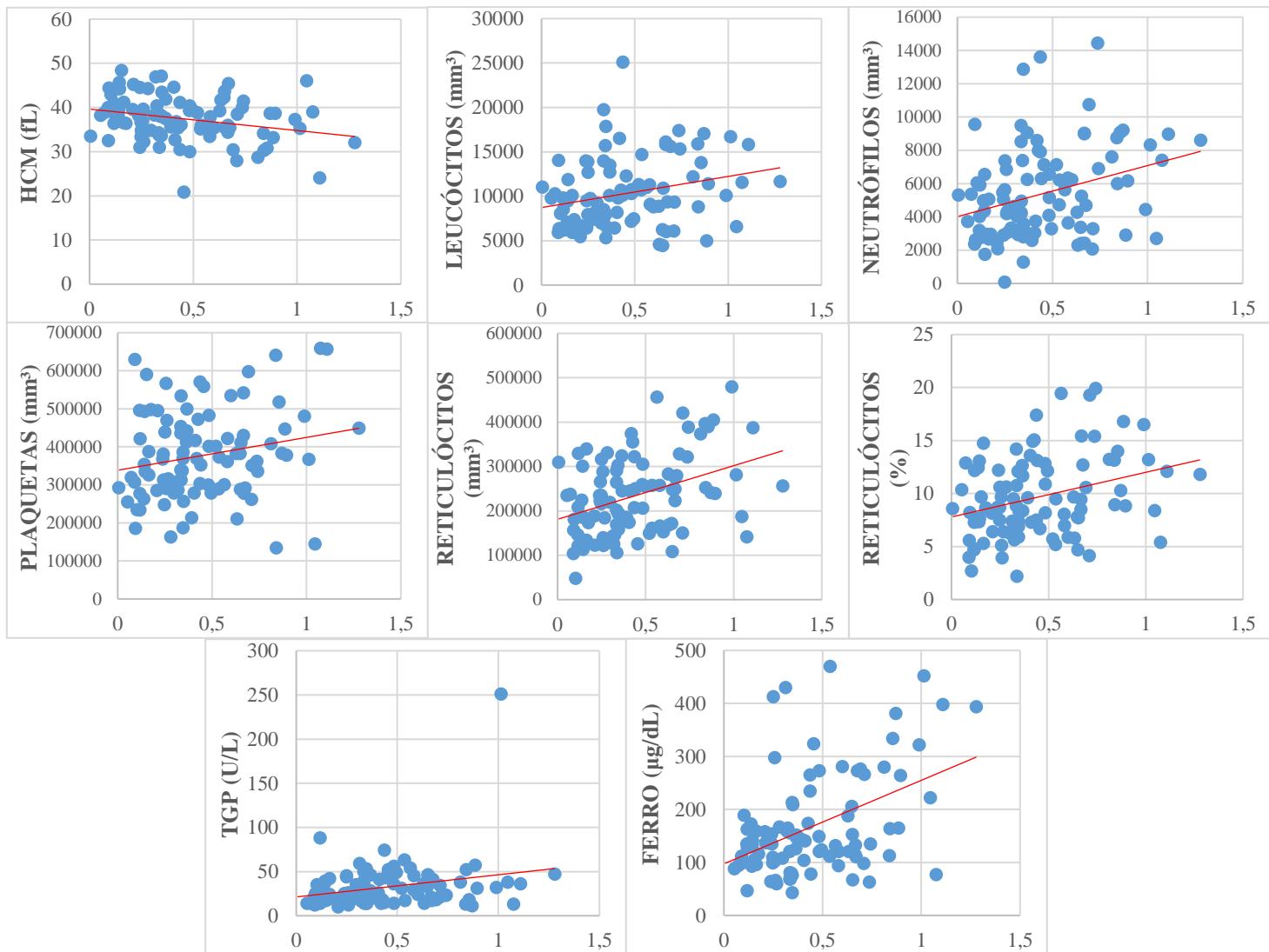


Figura 28 - Análise de correlação dos níveis de expressão do gene *ATM* e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme



Expressão do gene *ATM* ($2^{-\Delta Cq}$)

Figura 29 - Análise de correlação dos níveis de expressão do gene *ATR* e variáveis clínico-laboratoriais em pacientes com anemia falciforme



Expressão do gene *ATR* ($2^{-\Delta Cq}$)

Com o propósito de também investigarmos a influência que a expressão e ativação de um gene possa induzir sobre a expressão de um outro, a análise da correlação entre os genes de estudo foi mensurada a partir do Teste de Correlação de Pearson, evidenciando uma correlação significativa e positiva entre todos os genes de estudo, conforme demonstrada pela tabela 37, com variação de significância de 95% ou 99%.

Tabela 37 - Análise de correlação entre os genes responsivos à hipóxia de pacientes com anemia falciforme

Variáveis	Coeficiente de correlação – “r”			
	<i>HIF-1α</i>	<i>VEGF</i>	<i>ATM</i>	<i>ATR</i>
<i>HIF-1α</i>	1	0,68**	0,70**	0,53**
<i>VEGF</i>	-	1	0,79**	0,64**
<i>ATM</i>	-	-	1	0,64*
<i>ATR</i>	-	-	-	1

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: (*) significativa a 95% de confiança; (**) significativa a 99% de confiança. Teste de significância aplicado: Correlação de Pearson.

7 DISCUSSÃO

As evidências clínicas e epidemiológicas da AF não nos deixam dúvidas de que esta hemoglobinopatia tem um relevante impacto na morbimortalidade da população acometida pela doença, sendo reconhecida como a mais grave dentre as enfermidades falciformes e um preocupante problema de saúde pública mundial (CONRAN; TORRES, 2019; PIEL, 2016).

Este é o primeiro estudo, que temos conhecimento, que investiga a expressão de genes envolvidos na angiogênese e em mecanismos de danos e reparos ao DNA em pacientes com AF e em resposta à condição de hipóxia, causante do desenvolvimento e agravamento da doença. Adicionalmente a isso, trata-se de uma investigação singular da associação e influência dose-efeito da HU na transcrição de *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR*, e interposição em parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes falciformes.

Após pouco mais de 100 anos desde sua primeira descrição na literatura, esta doença continua sendo alvo de diversos estudos que visam melhor entender e explicar as consequências decorrentes da presença da Hb S no indivíduo e a demasiada heterogeneidade observada tanto nas manifestações clínicas e sintomas, como na resposta do paciente ao tratamento. Além disso, ainda há muito a se esclarecer sobre os impactos e efeitos diversos dos fatores ambientais e genéticos sobre o desenvolvimento, gravidade e prognóstico da doença.

Depreende-se, entretanto, que os mecanismos e componentes fisiopatológicos ainda não estão completamente esclarecidos e que diversos são os fatores que interferem e influenciam no estado clínico do paciente. Torna-se de salutar importância, portanto, o surgimento e continuidade de estudos e pesquisas que busquem ampliar tal conhecimento, a partir do conhecimento do próprio paciente e da forma que a doença se manifesta e progride nele. Deste modo, será possível fornecer estratégias terapêuticas e/ou farmacológicas mais eficazes e eficientes, que promovam uma melhor predição do quadro clínico individual e vias de manejo de tratamento e intervenções mais acertadas, com mais segurança e menos efeitos adversos e indesejáveis.

Este estudo vem ao encontro dessas inquietações sobre a AF, tendo como foco principal investigar a doença a partir de uma característica que lhe é peculiar, comum e motriz, e muitas vezes é esquecida ou subestimada, a *hipóxia*.

Pacientes com AF foram caracterizados mediante biomarcadores hematológicos e bioquímicos e manifestações clínicas apresentadas pelos mesmos, sendo, *a posteriori*, avaliados o uso da HU e a expressão de genes envolvidos nos mecanismos de hipóxia nesses pacientes.

A caracterização da população de estudo demonstrou ser constituída, em sua maioria, por indivíduos provenientes da zona rural (interior) e do sexo feminino. O perfil laboratorial e clínico retratado nesta população assemelha-se àqueles relatados na literatura (CARVALHO *et al.*, 2015; CESAR *et al.*, 2019; MAKANI *et al.*, 2018; MEHER *et al.*, 2019), revelando um alto grau de anemia e hemólise, baixas taxas de Hb e hematócrito, reticulocitose, leucocitose, níveis elevados de LDH, bilirrubinas, transaminases e ferritina.

Aproximadamente metade dos pacientes examinados relataram algum tipo de complicação ou intercorrência relacionada à doença, tais como coledolitíase, dispneia, astenia, cardiopatia, STA e infecções por pneumococos em história progressiva de vida. Dentre as complicações cardíacas, as mais mencionadas foram: insuficiência mitral e tricúspide, taquicardia, dilatação do ventrículo esquerdo e da raiz da aorta, aumento do átrio D e/ou E, refluxo tricúspide, mitral e aórtico, sopro sistólico pancardíaco, derrame pericárdico, arritmia, miocardiopatia dilatada, déficit de relaxamento ventricular, prolapso mitral, hipertrofia concêntrica e sobrecarga ventricular.

Dos pacientes que informaram episódios constantes de pneumonia em infância/juventude, cerca de 10% deles afirmaram terem sido acometidos por mais de 20 ocorrências da doença. Números igualmente preocupantes foram observados quanto à frequência de outras complicações clínicas averiguadas, como por exemplo, a frequência de problemas renais e úlceras em membros inferiores em cerca de um terço dos pacientes, infecções recorrentes em quase 30% dos indivíduos e eventos de hepatomegalia em 36,08%. Dentre os problemas renais descritos pelos pacientes do corrente estudo, frisam-se: hipercogenidade das pirâmides aumentadas, nefropatia parenquimatosa (difusa crônica bilateral ou unilateral), nefrocalcinose, insuficiência renal, proteinúria, nefrolitíase e glomerulonefrite difusa aguda (GNDA). Dos pacientes do sexo masculino, cerca de 17,08% relataram já terem apresentado pelo menos um episódio de priapismo. Números semelhantes aos citados acima, de frequência de complicações clínicas em pacientes falciformes, também foram descritos nos trabalhos de Belini Junior *et al.* (2015) e Alves (2012), em estudos conduzidos nos estados do Rio de Janeiro e Bahia, respectivamente.

Quanto à informação sobre histórico de crises álgicas, quase todos os pacientes declararam episódios regulares de dor. Destes, 38,14% e 17,52% referiram terem sido acometidos por, respectivamente, de 3 a 6 episódios e mais de 6 episódios de dor no último ano que antecedeu ao estudo. Contudo, cerca de 16,50% alegaram ausência de dor nos últimos 12 meses e duas pacientes (2,06%) afirmaram nunca terem sentido crises álgicas durante a vida,

tendo descoberto que eram pacientes de AF apenas na idade adulta, em decorrência de exames pré-natais e pré-operatórios para realização de cirurgia cesariana.

Em relação às internações hospitalares em virtude de intercorrências da doença, a vasta maioria dos pacientes reportou já ter necessitado de internação hospitalar, demonstrando, assim, quão grande inconveniência e desgaste traz essa doença ao paciente, aos familiares e sistema público de saúde. Dentre os principais motivos das internações mencionadas, destacam-se: crises álgicas, pneumonias, infecções, CVO, STA, artralgia e dores ósseas, úlceras nas pernas, colelitíase, AVC e para realização de transfusões sanguíneas.

Em relação às transfusões sanguíneas, a maioria dos pacientes relatou já ter sido submetida a este procedimento devido à doença, dos quais, 13,40% já fizeram uso de mais de 20 vezes durante a vida. Além disso, pequeno percentual dos pacientes do estudo declarou ter apresentado reação transfusional em decorrência da exposição e risco do procedimento transfusional, sendo os anticorpos anti-C, anti-K, anti-E e anti-Fy^a os mais desenvolvidos nesses eventos. Estes dados são semelhantes aos resultados encontrados por Felix, Souza e Ribeiro (2010), cuja investigação também identificou que 80% dos pacientes falciformes de seu estudo já haviam sido submetidos à transfusão sanguínea em decorrência da doença.

A análise dos escores de gravidade da DF revelou que a maior parte dos pacientes atendidos pelas instituições de saúde participantes deste estudo apresentava o fenótipo leve na classificação de risco de morte em 5 anos, sendo seguido pelos fenótipos intermediário (ou moderado) e grave, nesta ordem. Dois outros estudos realizados nos extremos do Brasil (Rio de Janeiro e Amazonas), utilizando o mesmo instrumento de medição de gravidade, identificaram que a maioria de sua população de pacientes era de classificação moderada, no Rio de Janeiro, e grave (pelo valor da média dos escores), no estado do Amazonas, considerando apenas indivíduos com idade ≥ 18 anos (BELINI JUNIOR *et al.*, 2015; CESAR *et al.*, 2019). A distinção na classificação dos três estados supracitados pode-se dever à diferença no número de pacientes, à disparidade quanto às condições socioeconômicas da população e à discrepância quanto às condições assistenciais ou de facilidade de locomoção e busca por atendimento médico. Estes dados demonstram ainda que, aparentemente, os pacientes atendidos nas instituições de referência do estado do Ceará estão sendo bem monitorados e assistidos adequadamente, fazendo a grande maioria de seus pacientes permanecer em um quadro clínico menos agressivo e crítico.

A caracterização dos pacientes quanto ao tratamento e uso de medicamentos evidenciou que praticamente todos faziam uso de ácido fólico desde o diagnóstico da doença. Dentre os principais fármacos paliativos para alívio das intercorrências clínicas, manifestadas em até 12

meses do início do estudo, sobressaíram o uso de dipirona, omeprazol e paracetamol. Devido às fortes e constantes crises algicas, o uso de analgésicos é bastante usado pelos pacientes, conforme relatos deles próprios, havendo ainda a possibilidade de que a frequência declarada possa até estar subestimada, tanto em decorrência do esquecimento dos pacientes no ato da declaração, como em razão da não notificação nos prontuários, por parte dos profissionais que os acompanham.

As crises algicas, agudas ou crônicas, são as complicações mais frequentes e duram em torno de 3 a 5 dias. É uma das primeiras manifestações da doença e inicia-se aos 6 meses de vida. São causadas pelo dano tissular isquêmico, secundário à obstrução do fluxo sanguíneo pelos eritrócitos falcizados. A redução do fluxo sanguíneo, por sua vez, ocasiona hipóxia regional e acidose, que podem acelerar o processo de falcização, aumentando o dano isquêmico (BALLAS, 2018; SOUZA *et al.*, 2016). Segundo Souza *et al.* (2016), os analgésicos mais utilizados no tratamento das DF são: - Analgésicos não opioides: dipirona, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico (AAS), paracetamol. - AINE: AAS, diclofenaco, indometacina, ibuprofeno. - Opioides fracos: codeína, cloridrato de tramadol. - Opioides potentes: morfina, fentanila, petidina, buprenorfina, nalbufina, metadona, oxicodona. - Adjuvantes: anticonvulsivantes, antidepressivos, neuroléptico, benzodiazepínico, anticolinérgico.

Aproximadamente 70% dos pacientes faziam uso do medicamento HU como tratamento principal e diário. Aqueles que não faziam administração da HU, não o faziam por indicação médica, tomando por base o monitoramento das taxas hematológicas e bioquímicas do paciente, julgando desnecessário assumir o risco dos efeitos adversos naquele indivíduo, ou por intolerância ou falta de adesão dos pacientes, ou por não responsividade adequada ou mesmo resposta nula à HU (ainda por mecanismos desconhecidos).

Atualmente, as opções terapêuticas disponíveis mais eficazes para o tratamento da AF são o TMO e a HU. O TMO, apesar de ser a medida curativa para a doença, traz o impasse da morosa busca pela compatibilidade entre doador e paciente. É também considerado um procedimento de alto risco por apresentar diversos graus de complicações e significativo nível de mortalidade do receptor (ANSARI; GAVINS, 2019; KATO *et al.*, 2018; TORRES; CONRAN, 2019).

Demasiados estudos têm reportado e ratificado a eficácia da HU em portadores de AF. Até o presente momento, ela constitui o avanço mais importante e é considerada a mais promissora dentre as terapias disponíveis para o tratamento do indivíduo doente, sendo-lhe atribuídos diversos mecanismos de ação. Os principais efeitos incluem a indução da melhora clínica e hematológica do paciente, reduzindo a incidência da falcização, hemólise e de

episódios vaso-oclusivos, principalmente pelos seus efeitos múltiplos sobre a linhagem eritrocitária e parâmetros relacionados (MATTE *et al.*, 2019; PICCIN *et al.*, 2019).

É atribuída à HU a elevação na concentração de Hb F em cerca de 60% dos pacientes tratados, aumento na taxa de Hb, do VCM e a redução do número de leucócitos, plaquetas e reticulócitos (CANÇADO *et al.*, 2009; SILVA; SHIMAUTI, 2006). Estes dados também foram encontrados em nosso estudo, onde se observou um aumento significativo de cerca de 78% na concentração de Hb F no grupo de pacientes em tratamento, quando comparados aos pacientes sem tratamento com o referido fármaco. De igual forma, também foi demonstrado tanto uma elevação significativa nos níveis de Hb, hematócrito e VCM, como o decaimento do número de reticulócitos, leucócitos e plaquetas no grupo SSHU. Estes achados podem representar um indício positivo de que o medicamento gerou um efeito protetor contra o fenômeno de falcização dos eritrócitos, de adesão celular e formação de vaso-oclusão, com consequente redução no processo de hemólise e anemia. Corroboram com esses dados, os valores mensurados do LDH, bilirrubinas e ferro nos pacientes do estudo, uma vez que a redução significativa desses parâmetros bioquímicos no grupo em tratamento sugere uma redução no número de eritrócitos lisados em consequência de uma possível redução na polimerização de Hb S pelo aumento de Hb F.

Também foi observada uma diminuição significativa na quantidade de episódios de dor sentida pelos pacientes em tratamento, e o número de pessoas que sofriam de dispneia foi consideravelmente menor no grupo SSHU, quando comparado ao grupo SS.

Lanzkron *et al.* (2008), em um estudo sobre o consenso do uso de HU em pacientes adultos com AF, notaram que os níveis de Hb total foram mais altos no grupo que recebeu a HU, após 2 anos de tratamento. O mesmo aconteceu com os níveis de Hb F. Já o número médio de crises álgicas foi 44% mais baixo do que no grupo controle (pacientes não tratados). As internações e outras eventuais complicações também caíram de forma significativa.

Curiosamente, a frequência de pessoas cardiopatas foi maior no grupo que fazia uso de HU ($p = 0,03$), porém, como este estudo não teve o caráter prospectivo de acompanhar os pacientes antes e após a administração da HU, pode-se justificar esse achado pelo reconhecido efeito protetor e orientação de uso da HU em complicações (prévias) relacionadas às cardiopatias e problemas renais na AF. O manejo dos danos em órgãos-alvo representa um grande desafio para os indivíduos que vivem com DF. A prevenção e tratamento de complicações relacionadas à AF, como doenças cardiopulmonares e renais, são especialmente desafiadores para os profissionais de saúde, e, portanto, são o foco de muitas diretrizes e manuais de manejo ao portador de DF (LIEM *et al.*, 2019).

Trabalhos recentes, como os de Di Maggio *et al.* (2019) e da *American Society of Hematology* (ASH) (LIEM *et al.*, 2019) têm abordado questões específicas relacionadas à triagem, diagnóstico e gerenciamento das complicações falciformes. Sendo assim, estudos têm dado ênfase especial nas áreas de triagem, monitoramento e controle da hipertensão pulmonar; triagem para doença pulmonar crônica e para respiração com distúrbios do sono; manejo da hipertensão sistólica; manejo da proteinúria e doença renal crônica; manejo da anticoagulação do tromboembolismo venoso e eventos cerebrovasculares em pacientes com AF. Ambos os estudos defendem a tomada de decisão compartilhada sobre estratégias de gestão, incluindo a iniciação ou otimização de terapias modificadoras dessas complicações, como a hidroxuriéia, e o uso de transfusões ou agentes estimuladores de eritropoiese (DI MAGGIO *et al.*, 2019; LIEM *et al.*, 2019).

Embora a HU seja mais conhecida por alterar a cinética da proliferação eritróide e produção de células com características fetais, as células F, que estimulam diretamente a síntese de Hb F e inibem a síntese de novas moléculas de Hb S (LUZZATTO; MAKANI, 2019; TSHILOLO *et al.*, 2019), existem relatos que sugerem que a HU, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é capaz de produzir moléculas de NO e aumentar a sua biodisponibilidade na circulação dos pacientes. Tais ações parecem favorecer a vasodilatação e reprimir a atividade de moléculas de adesão e formação de radicais livres, além de induzir a expressão de γ -globina em progenitores de células eritróides através da ativação da via dependente de GMPc (MATTE *et al.*, 2019; TORRES; CONRAN, 2019).

Ao estratificarmos os pacientes em terapia com HU, conforme doses habituais de administração do fármaco, e analisarmos as características laboratoriais, clínicas, complicações recorrentes e fenótipos de gravidade, observou-se variação significativa apenas nos parâmetros de VCM, Hb F, LDH e AST. Esses achados sugerem que doses maiores do medicamento estão relacionadas a um efeito maior na elevação de VCM e Hb F, bem como a uma redução das enzimas relacionadas à lise celular (LDH e AST).

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, Pedrosa (2013) demonstrou uma relação inversamente proporcional entre a dose do medicamento HU e o nível de LDH liberado por neutrófilos. Nossos dados demonstraram que os pacientes que fizeram uso de uma quantidade maior da substância obtiveram uma maior proteção contra o dano celular, representado pela detecção de níveis mais baixos da enzima.

Embora, poder-se observar uma tendência efeito-dose em algumas outras variáveis, tais como: número de eritrócitos, leucócitos, neutrófilos, plaquetas, hematócrito e cardiopatia, nenhuma diferença significativa foi identificada entre os grupos SSHU-0,5g, SSHU-1g e SSHU-

$\geq 1,5g$. Isso demonstrou que a alteração da posologia alterou de forma discreta a resposta nos demais parâmetros analisados, nesta população e nas condições deste estudo, mas não de forma significativamente expressiva.

Dados semelhantes, aos aqui encontrados, foram apresentados em outros estudos, demonstrando um aumento no nível plasmático de LDH em pacientes quando confrontados à indivíduos saudáveis e à pacientes em tratamento com HU. Essas evidências sugerem e ratificam o uso da quantificação da enzima como um bom parâmetro de hemólise, uma vez que se trata de uma enzima intracitoplasmática, liberada em decorrência de alterações na permeabilidade ou lise da membrana celular (CANÇADO *et al.*, 2009; KATO *et al.*, 2006; STEINBERG, 2008). A elevação da enzima está positivamente associada ao aumento de risco de pacientes falciformes virem a sofrer de priapismo, hipertensão pulmonar, úlceras cutâneas, resistência ao NO ou mesmo morte precoce (KATO *et al.*, 2006; REES; GIBSON, 2012; STEINBERG, 2008).

Uma vez que a HU está envolvida no aumento da Hb F e, conseqüentemente, na redução da falcização eritrocitária, CVO e hemólise, níveis plasmáticos mais baixos de LDH são encontrados em pacientes que fazem uso de terapia com HU, em relação aos pacientes que não fazem uso do medicamento (STEINBERG, 2008). Cartron e Elion (2008), discutindo as CVO como sendo de fisiopatologia complexa e multifatorial, e dando importância às interações intercelulares mediadas pelas moléculas de adesão presentes nas células sanguíneas e endoteliais, descreveram que a terapia com HU promove a diminuição da adesividade, com conseqüente diminuição dos processos vaso-oclusivos e morte celular. E isso seria um fator preponderante para uma redução dos níveis de LDH na AF.

Investigando moléculas de adesão em pacientes em situações normóxicas e hipóxicas, Kim *et al.* (2017) descreveram que a hipóxia tem sido um foco atraente de seus estudos, uma vez que pode estar associada às síndromes clínicas na AF, incluindo CVO, priapismo e dessaturação noturna de Hb, e pode ter forte impacto na indução de STA e úlceras nas pernas. Além disso, esses pesquisadores relataram que os pacientes que apresentaram adesão eritrocitária aumentada por hipóxia, também exibiam níveis mais elevados de moléculas de adesão solúveis (VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, E-selectina e Fator Von Willebrand (FVW)), de ferro, ferritina, liberação de heme, LDH, reticulócitos e leucócitos. Em contrapartida, apresentavam menores valores nas concentrações de Hb F e Hb total. Tais alterações sugerem um fenótipo clínico mais agressivo, com maior necessidade de transfusões sanguíneas, bem como uma ativação endotelial mais exarcebada, com maior incidência de inflamações e

hemólise naqueles pacientes (em situação de hipóxia) do que nos pacientes em condição de normóxia.

Sabe-se que a hipóxia desempenha um papel crucial na fisiopatologia de várias doenças, tais como câncer, neurodegeneração, AVC e Alzheimer, representando um indicador de mau prognóstico e fenótipo severo (CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; MACHOGU; MACHADO, 2018). Embora, ainda não se saiba muito das vias de atuação, como em outras patologias, acredita-se que, nas doenças falciformes, a hipóxia também possa regular muitos processos fisiológicos e patológicos, particularmente através da ativação da família HIF (SUN; XIA, 2013).

No presente estudo, foi demonstrado uma alteração significativa no perfil de genes responsivos à condição de hipóxia por que passam os pacientes com AF. Uma superexpressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* foi observada em todos os pacientes falciformes quando comparados aos indivíduos saudáveis. Tal observação nos permite sugerir que a baixa tensão e disponibilidade de O₂ nesta hemoglobinopatia, além de induzir a polimerização de Hb S, também pode estar relacionada ao incitamento de diversos mecanismos fisiopatológicos na doença, muitos dos quais ainda classificados com causas ou heterogeneidade desconhecidas.

Indivíduos com faixas etárias mais elevadas apresentaram discreto aumento na expressão gênica em relação aos indivíduos mais jovens. De igual forma, uma maior expressão gênica, porém, também sem significância estatística, foi observada no grupo de indivíduos que relataram maior quantidade de internações no período de um ano da data do estudo. Contudo, esses dados precisam ser melhor investigados para serem discutidos.

Na AF, a expressão dos genes supracitados pode promover a ativação ou silenciamento de inúmeros outros genes e a transcrição de mRNA e/ou tradução de proteínas envolvidos em eventos localizados ou a níveis sistêmicos de forma imensurável. Alterações no metabolismo energético, no metabolismo da glicose, de aminoácidos e nucleotídeos, angiogênese, lesões no DNA, modificações nos mecanismos de reparo de danos na cromatina e resistência às drogas em tratamentos são alguns dos exemplos (HAMMOND *et al.*, 2014; SEMENZA, 2003).

Notavelmente, na análise da Correlação de Pearson entre os genes de estudo, foi observado uma significância positiva entre todos os genes pesquisados, levando-nos a sugerir que o gene *HIF-1 α* está a montante, e cuja expressão também pode ser responsável tanto pela elevação da expressão como pela ativação dos demais genes em pacientes com AF.

Fortes correlações entre a expressão dos genes aqui investigados e parâmetros clínicos e laboratoriais foram observadas neste estudo. Variáveis hematológicas, como a concentração de Hb total e hematócrito, foram correlacionadas de forma negativa com os genes *HIF-1 α* e

VEGF. Surpreendentemente, também foi demonstrada uma significativa correlação inversa entre a expressão dos genes estudados e a concentração de HCM, VCM e Hb F (nestas duas últimas variáveis, apenas *versus HIF-1 α , VEGF e ATM*). Outros parâmetros analisados, como contagem de leucócitos, reticulócitos e plaquetas, e determinadas variáveis bioquímicas, tais como LDH, ferro, bilirrubina e AST, apresentaram correlação positiva com a expressão gênica.

Na análise do cruzamento dos diferentes níveis de concentração de Hb F e expressão gênica, observou-se que concentrações mais baixas da Hb estão relacionadas a uma maior expressão de *HIF-1 α* e *VEGF*, e *vice-versa*. À medida que o nível de Hb F aumenta, diminui a expressão gênica de *HIF-1 α* e *VEGF*. Vale ressaltar que, na AF, baixas concentrações de Hb F estão diretamente associadas à altas concentrações de Hb S e maior probabilidade de ocorrer polimerização da Hb e obstruções vasculares (comumente acompanhadas de crises álgicas e episódios de inflamação e hemólise) (HEBBEL; VERCELLOTTI, 2018; KATO *et al.*, 2018). Em decorrência disso, pode-se instaurar hipóxia tecidual e crises isquêmicas capazes de, não apenas induzir a não degradação e a estabilização das proteínas HIF-1 α , como também estimular a expressão dos genes *HIF-1 α* e *VEGF* para corrigir o déficit de O₂ acarretado. Destarte, uma vez ativos, os genes *HIF-1 α* podem também promover a ativação de inúmeros outros genes e principiar diversos mecanismos e respostas fisiológicas, via ativação do sistema hipóxia/*HIF-1 α* .

Corroborando os nossos resultados, em um estudo realizado em camundongos falciformes, Kaul *et al.* (2013) demonstraram que a expressão de *HIF-1 α* diminui concomitantemente com o aumento da Hb F e da biodisponibilidade de NO, com forte correlação inversa com os níveis plasmáticos de metabólitos de NO (NO_x). Nessa conjuntura, *in vitro* e em animal, estudos clínicos vêm sendo desenvolvidos para ratificar a hipótese do potencial terapêutico dos inibidores de PHD no tratamento das hemoglobinopatias. Evidências sugerem que a estabilização e ativação das proteínas HIF-1 α podem desempenhar um importante papel aditivo aos efeitos da HU, ou seja, na indução da expressão de Hb F em células eritróides humanas primárias (CHAN *et al.*, 2016; HSIEH *et al.*, 2007; KAUL *et al.*, 2012). Esse aumento na concentração de Hb F também é acompanhado por uma melhora dos demais parâmetros hematológicos e clínicos, como a taxa de Hb total, índices hematimétricos e biomarcadores de hemólise.

De fato, uma relação entre a via HIF e a expressão de Hb F foi proposta em 2016 por Chan *et al.* Diversos locais putativos de ligação e transcrição do *HIF-1 α* vêm sendo descritos neste foco, fazendo despertar sobre essa via uma nova direção para se investigar a indução da

Hb F e descobertas de novas abordagens terapêuticas para diversas doenças (CHAN *et al.*, 2016).

Uma vez ativada, ou pela deficiência de O₂ ou pelo uso de inibidores de PHD, a via HIF, *in vitro*, induz a expressão da eritropoietina que, por sua vez, promove a expressão da Hb F em células primárias da medula óssea humana (CHAN *et al.*, 2016; HSIEH *et al.*, 2007). Além disso, a produção de proteínas anti-isquêmicas que melhoram a vasoconstrição e o estresse oxidativo, tais como a adrenomedulina, heme oxigenase, VEGF e endotelina, estão sendo avaliadas em modelos experimentais e estudos clínicos iniciais, e a expressão dos respectivos genes estão sendo associados à expressão do *HIF-1α* (CHAN *et al.*, 2016; HSIEH *et al.*, 2007; KAUL *et al.*, 2013). Entretanto, a diminuição proporcional da expressão de *HIF-1α* com aumento nos níveis de Hb F em camundongos falciformes foi acompanhada por uma diminuição distinta nas formas solúveis de marcadores de ativação endotelial, como sP-selectina e sVCAM-1, sugerindo que ainda há a necessidade de mais estudos para substanciais elucidações (KAUL *et al.*, 2013).

Ao cruzarmos a variável ‘quantidade de episódios de dor no último ano’ com as expressões gênicas de *VEGF* e *ATM*, observamos que os pacientes, que mencionaram ter apresentado mais de 08 crises álgicas nos últimos 12 meses, também exibiram um aumento significativo na expressão desses genes em relação àqueles que relataram um número ≤ 02 episódios de dor no ano ($p = 0,02$). Quanto a esta variável (quantidade de episódios de dor no último ano) e o *HIF-1α*, observou-se uma maior expressão entre os indivíduos que tiveram maior quantidade de crises álgicas, perfazendo um valor de $p = 0,05$. Normalmente, as crises álgicas estão associadas aos eventos de vaso-oclusão e isquemia, e estes eventos, como já discutido, estão implicados na ativação do gene *HIF-1α*, em resposta à condição de hipóxia gerada.

Na AF, o início, a progressão e a resolução de um episódio vaso-oclusivo apresentam características de lesão de isquemia-reperfusão, em decorrência de ciclos sucessivos de hipóxia e reoxigenação, os quais, geralmente, promovem um processo de inflamação e dano oxidativo (KAUL; HEBBEL, 2000; SUN; XIA, 2013). Deve-se, principalmente, à reoxigenação a produção de ERO e danos à fita de DNA (DNA-SSB (dano em fita simples) e DNA-DSB), especialmente na fase G₂ do ciclo celular (BRISTOW; HILL, 2008; CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009).

Kaul e Hebbel (2000) demonstraram que, em situações de hipóxia/reoxigenação, camundongos falciformes transgênicos exibiam um maior dano inflamatório que camundongos transgênicos em normóxia ou normais. Essa resposta inflamatória foi acompanhada por um

aumento do número de leucócitos periféricos em 1,7 vezes e de neutrófilos em até 3 vezes. Além disso, esses leucócitos se comportaram mais aderentes e emigrados, e também foi evidenciado um aumento na produção de oxidantes pelas células endoteliais vasculares.

O pressuposto de que a hipóxia pode induzir inflamação ganhou aceitação geral da comunidade científica a partir de estudos da via de sinalização da hipóxia, sobretudo com a descoberta do sistema HIF (ELTZSCHIG; BRATTON; COLGAN, 2014; ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011). O inverso dessa inferência também é verdadeiro (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011).

Curiosamente, ao analisarmos o cruzamento da expressão gênica com a presença ou não de comorbidades e/ou intercorrências clínicas, observou-se uma associação apreciável para as variáveis: cardiopatia (*vs ATM* e *ATR*), crise convulsiva (*vs HIF-1 α*), colelitíase (*vs HIF-1 α*) e úlcera MMII (*vs ATM*). Embora, relativamente, ainda pouco se saiba, estudos têm sido direcionados para investigar a fisiologia e envolvimento dessas patologias/manifestações com a expressão do genes supracitados. Espach *et al.* (2015), por exemplo, destacam o papel do gene *ATM* no contexto cardiovascular, nomeadamente no estresse oxidativo, aterosclerose, complicações metabólicas, resistência à insulina e remodelação cardíaca, assegurando que a deficiência ou alteração do *ATM* pode estar associada à diminuição da função cardíaca e aumento da apoptose de miócitos cardíacos. Neste mesmo contexto, estudos de associações entre a convulsão (GUALTIERI *et al.*, 2013) e colelitíase (ASAI *et al.*, 2017) com a expressão do gene *HIF-1 α* ou de associações de úlceras MMII com marcadores de hipóxia ou uso de HU (QUATTRONE *et al.*, 2013) vêm sendo desenvolvidos com o propósito de elucidar a participação genética nos mecanismos fisiopatológicos das doenças.

No presente estudo, os pacientes que apresentaram tais manifestações exibiram uma menor expressão gênica em relação aos que relataram ausência dessas intercorrências. Como hipótese desse achado, propomos que uma vez acometidos por tais intercorrências clínicas, a maioria desses pacientes faça parte do grupo de indivíduos tratados com a HU, cuja ação está associada com a redução dos sinais de hipóxia e, portanto, da expressão gênica mediada pela baixa tensão de O₂. Tal suposição também pode ser confirmada pelos dados da tabela 19.

De fato, ao investigarmos a população de estudo conforme a terapia praticada e o perfil gênico mensurado, evidenciamos que o uso da HU foi capaz de reduzir significativamente a expressão de todos os genes analisados no grupo de pacientes em tratamento com o fármaco. Além disto, ao analisarmos o cruzamento triplo entre expressão gênica, variáveis demográficas e clínicas (e suas subcategorias) com o uso ou não de HU, observamos uma diferença significativamente relevante em praticamente todas as análises empreendidas. Dessa forma,

demonstramos que a HU é capaz de modificar as manifestações clínicas e exames laboratoriais de pacientes falciformes via modulação da expressão de genes responsivos à hipóxia.

Considerando, ainda, o perfil gênico entre os pacientes em tratamento com HU, observou-se um comportamento distinto na expressão de cada gene de acordo com a dose de medicamento administrado. Embora seja evidente uma expressiva redução, nenhuma diferença significativa foi observada na expressão dos 4 genes ao compararmos os pacientes do grupo SSHU-0,5g com os pacientes sem terapia com HU (grupo SS). No entanto, uma significativa redução na expressão de *HIF-1 α* e *VEGF* foi percebida nos grupos SSHU-1g e SSHU- \geq 1,5g ao confrontarmos com o grupo SSHU-0,5g. Nas análises dos genes *ATM* e *ATR*, houve uma redução expressivamente relevante no grupo de pacientes SSHU-1g em relação ao grupo SSHU-0,5g e, surpreendentemente, evidenciou-se uma elevação na expressão do gene *ATR* dos pacientes SSHU- \geq 1,5g em relação aos pacientes SSHU-1g.

Sabe-se que *ATM* e *ATR* são as principais quinases de resposta ao estresse que respondem a uma variedade de insultos, incluindo radiação ionizante, parada de replicação, radiação ultravioleta e hipóxia/reoxigenação (HAMMOND; GIACCIA, 2004). Adicionalmente a esses estímulos, a HU, um potente inibidor da ribonucleotídeo redutase, age como um importante indutor de estresse de replicação, por interromper a replicação de DNA através de seus efeitos nos pools de desoxinucleotídeos celulares, bem como um importante indutor de danos ao DNA, especialmente por induzir DNA-DSB (KUROSE *et al.*, 2006). A enzima responsável pela produção de nucleotídeos, usados para formar ou reparar moléculas de DNA, é a ribonucleotídeo redutase, que depende do O₂ celular para sua função e, portanto, é provável que seja severamente comprometida, tanto pelas condições hipóxicas, como pela ação da HU (HAMMOND *et al.*, 2014; OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010). Dessa forma, a HU é capaz de ativar e causar padrões complexos de expressão gênica de *ATM* e *ATR* (CUADRADO *et al.*, 2006; HAMMOND; GIACCIA, 2004; KUROSE *et al.*, 2006; LESZCZYNSKA *et al.*, 2016; WU; MIYAMOTO, 2008). Tal hipótese também foi demonstrada e é sugerida em nossas análises, com pacientes falciformes.

Vale ressaltar que, indutores de DNA-DSB ativam *ATM* e *ATR* de forma robusta, porém, os indutores de estresse de replicação ativam rapidamente o *ATR*, enquanto o gene *ATM* é ativado em menor grau e com uma cinética mais lenta (WU; MIYAMOTO, 2008). Além disso, o mecanismo de ativação de *ATM* e *ATR* em resposta ao estímulo da HU permanece controverso. Estudos referem *ATM* a montante de *ATR*, outros mencionam como a jusante, enquanto outros afirmam que a HU aciona as atividades de *ATM* e *ATR* por meio de caminhos

independentes, ou até que pode acionar o *ATR*, mesmo na ausência de atividade do *ATM*, por exemplo (CUADRADO *et al.*, 2006; WU; MIYAMOTO, 2008).

Em suma, pelo trabalho exposto, reiteramos que a hipóxia é um estresse fisiologicamente significativo, que influencia diversos processos celulares e metabólicos do organismo humano, cuja sinalização e consequências podem estar relacionadas, em parte, ao nível de O₂ presente, ‘ou ausente’ (por exemplo, hipóxia ou anóxia) e à duração da exposição hipóxica (hipóxia aguda, hipóxia crônica, ou em ciclo de hipóxia aguda *versus* hipóxia crônica ou prolongada) (KUMARESWARAN *et al.*, 2012). As células hipóxicas têm sido associadas à indução de geração de ERO, instabilidade genética, aberrações cromossômicas, repressão e/ou ineficiência do reparo de DNA, especialmente de DNA-DSB, progressão tumoral e aumento de metástases sistêmicas (GLAZER *et al.*, 2013; KUMARESWARAN *et al.*, 2012; OLCINA; LECANE; HAMMOND, 2010). O cenário de hipóxia também pode induzir à angiogênese, que pode ser benéfica ou não, à fármaco e quimioresistência, amplificação de genes pró- e anti-apoptóticos e à ativação/inativação de oncogenes e de genes supressores de tumor (BRISTOW; HILL, 2008; CHAN; KOCH; BRISTOW, 2009; GATALICA *et al.*, 2011; GLAZER *et al.*, 2013). Evidências atestam que os efeitos da hipóxia se devem, principalmente, à via HIF e à transcrição de seus genes alvos (KIM *et al.*, 2017; MACHOGU; MACHADO, 2018).

Ratificamos, em nossas análises, que os genes responsivos à hipóxia, aqui investigados, estão demasiadamente expressos em pacientes com AF e podem ser os principais genes ativos responsáveis pelo desenvolvimento da maioria dos mecanismos da fisiopatologia da doença falciforme.

Inferimos ainda que, devido à constante flutuação das tensões de O₂ na doença, as células hipóxicas desses pacientes podem sofrer frequentes estresses de bloqueio de replicação, seguidos de rápida reperfusão e reoxigenação, os quais podem induzir severos danos oxidativos, instabilidade e rearranjo genético, acúmulos de DNA-DSB e comprometimento do reparo do DNA. Tais alterações podem, potencialmente, ser observadas na AF, e justificam a hipótese de investigações acerca da possível associação da AF e subsequentes doenças malignas. Posto isto, podemos citar frequências elevadas de micronúcleos, aberrações cromossômicas basais em linfócitos, certos tipos de linfomas (como o linfoma associado à piotórax), leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica crônica e os carcinomas medulares renais; sendo esses últimos, considerados como fenótipo específico de portadores da Hb S, exibindo fortes alterações na expressão de *VEGF* e *HIF-1 α* e dos marcadores tumorais p53 e BCL-2 (ALVES *et al.*, 2008; BRUNSON *et al.*, 2017; GATALICA *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2005; SWARTZ *et al.*, 2002).

A HU exibiu capacidade de modular a expressão dos genes em estudo, demonstrando habilidade de relação dose-efeitos anti-hipóxicos, evidenciando redução no perfil gênico em pacientes em tratamento. No entanto, seu uso também pode estar relacionado a mecanismos de estímulos e/ou danos adicionais aos pacientes em hipóxia, especialmente no que tange aos genes envolvidos na sinalização de dano e reparo do DNA, fazendo-se necessário mais estudos para clarificar tal participação.

Nossos resultados corroboram com o título atribuído à doença, por Sun e Xia (2013): ‘*anemia falciforme, doença de hipóxia*’, e enfatizam a importância de elucidar os efeitos da hipóxia no nível molecular, celular e orgânico em pacientes com AF. Vale ressaltar que, apesar do avanço neste contexto, pouco ainda se sabe sobre o real impacto da condição hipóxica *in vivo*, ou em quais situações pode exacerbar um fenótipo mais agressivo ou maligno na AF, bem como de seus efeitos em longo prazo ou em intensidade e duração diferentes, nos haplótipos e polimorfismos de genes, e ainda de sua total regulação no maquinário genético humano, via Sistema HIF.

É certo que o *HIF-1 α* é cada vez mais estudado devido ao seu potencial terapêutico percebido, ao estimular fatores contra a deficiência de O₂, no entanto, uma desregulação na via HIF pode desencadear muitos malefícios. A inibição ou estimulação de sua atividade transcricional através de drogas é agora um alvo muito atraente e de grande fascínio, com altíssimo potencial de uso na intervenção terapêutica para o tratamento tanto da anemia falciforme, como de muitas outras doenças humanas hipóxicas.

8 CONCLUSÕES

Da análise dos dados ora apresentados, podemos, sucintamente, concluir:

- A população em estudo apresenta perfil clínico-laboratorial distintamente característico de pacientes acometidos de AF, sendo, predominantemente, assistida clinicamente pelo serviço ambulatorial do hemocentro partícipe, oriunda do interior do estado, do sexo feminino e com idade média de 31,76 anos.
- Os genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* apresentaram uma superexpressão em pacientes com AF, demonstrando forte e significativa correlação com variáveis clínico-laboratoriais, especialmente com a concentração de Hb F e índices hematológicos, podendo estar relacionados com a patogênese da doença.
- Deprendemos que a maioria dos pacientes investigados exibem fenótipo leve quanto à gravidade clínica de risco de morte em 05 anos, sem associação relevante com o uso de HU ou expressão gênica.
- Intercorrências clínicas observadas em mais da metade dos pacientes incluíam: dispneia, astenia, colelitíase, pneumonia, crises algícas e transfusões sanguíneas. Surpreendentemente, evidenciamos uma significativa associação entre cardiopatia e úlcera MMII com marcadores de dano ao DNA (*ATM/ATR*); crise convulsiva e colelitíase com marcadores de angiogênese (*HIF-1 α*) e quantidade de episódios de dor com os dois tipos de marcadores estudados (*VEGF/ATM*).
- Os pacientes em uso de HU apresentaram níveis reduzidos dos biomarcadores clínicos e de expressão gênica, evidenciando que a HU possui capacidade de modular a expressão de genes responsivos à hipóxia na AF e, possivelmente, seus mecanismos e efeitos.
- O tratamento com HU foi associado positivamente com a melhora nos parâmetros laboratoriais e manifestações da doença, demonstrando apresentar relação dose-efeito com a expressão dos genes investigados. Contudo, doses mais elevadas da HU parecem influenciar positivamente a ativação e expressão de *ATM* e *ATR*, merecendo mais investigações e monitoramento adequado.

• CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Em síntese, de forma inédita, demonstramos que a hipóxia na AF, além de induzir a polimerização da Hb S nos eritrócitos dos pacientes, também é responsável por alterações na expressão de genes capazes de promover e/ou exacerbar os mecanismos fisiopatológicos da doença. Igualmente, demonstramos que a HU exerce ação dose-efeito capaz de modificar as

manifestações clínicas e exames laboratoriais de pacientes falciformes via modulação da expressão de genes responsivos à hipóxia.

Estudos adicionais devem ser encorajados para clarificar as potenciais ingerências da hipóxia na fisiopatologia da AF, buscando identificar, não apenas, possíveis novos genes e vias de sinalização envolvidos no desenvolvimento da doença, como também novas estratégias terapêuticas personalizadas e projetadas para explorar as diferentes alterações e complicações da doença, via hipóxia, utilizando, novos ou já conhecidos, biomarcadores e drogas pró ou antiangiogênicas e de interesse no estresse de replicação e reparo do DNA, como terapia complementar à HU.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, D. M.; NASSAR, N. N.; ABD-EL-SALAM, R. M. Glibenclamide ameliorates ischemia–reperfusion injury via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. **Brain Res**, v. 1385, p. 257-262, 2011.
- AKINBAMI, A. *et al.* Haemoglobin F and A2 profiles among sickle cell anaemia patients in Lagos State University Teaching Hospital (LASUTH), Nigeria. **Ann Trop Pathol**, v. 9, n. 1, p. 26-31, 2018.
- AL-HABBOUBI, H. H. *et al.* The relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms on VEGF levels and the risk of vasoocclusive crisis in sickle cell disease. **Eur J Haematol**, v. 89, n.5, p. 403-409, 2012.
- ALLISON, A. C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. **Br Med J**, v. 1, n. 4857, p. 290-294, 1954.
- ALMEIDA, C. B. **Papel dos leucócitos na fisiopatologia da anemia falciforme**. 2011. 146 p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) – Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.
- ALVES, P. M. *et al.* Sensitivity to cisplatin-induced mutations and elevated chromosomal aberrations in lymphocytes from sickle cell disease patients. **Clin Exp Med**, v. 8, n. 1, p. 31-35, 2008.
- ALVES, R. J. **Aspectos epidemiológicos da doença falciforme e sua distribuição espacial em Feira de Santana no ano de 2010 a 2011**. 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Modelagem em ciências da terra e do ambiente)-Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – BA, 2012.
- ANIE, K. A. Psychological complications in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 129, n. 6, p. 723-729, 2005.
- ANSARI, J.; GAVINS, F. N. Ischemia-Reperfusion Injury in Sickle Cell Disease: From Basics to Therapeutics. **Am J Pathol**, v. 189, n. 4, p. 706-718, 2019.
- ANSARI, J. *et al.* Sickle cell disease: a malady beyond a hemoglobin defect in cerebrovascular disease. **Expert Rev Hematol**, v. 11, n. 1, p. 45-55, 2018.
- ARMENIS, I. *et al.* Reduced peripheral blood superoxide dismutase 2 expression in sickle cell disease. **Ann Hematol**, v. 98, n. 7, p. 1561-1572, 2019.
- ASAI, Y. *et al.* Activation of the hypoxia inducible factor 1 α subunit pathway in steatotic liver contributes to formation of cholesterol gallstones. **Gastroenterol**, v. 152, n. 6, p. 1521-1535. e8, 2017.
- ATAGA, K. I. *et al.* Crizanlizumab for the prevention of pain crises in sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 376, n. 5, p. 429-439, 2017.

AUFRADET, E. *et al.* Hypoxia/reoxygenation stress increases markers of vaso-occlusive crisis in sickle SAD mice. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 54, n. 3, p. 297-312, 2013.

BAIN, B. J. **Haemoglobinopathy diagnosis**. 3rd ed., Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. 433p.

BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. **Am J Hematol**, v. 87, n. 3, p. 338-338, 2012.

_____. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 68, n. 2-3, p.105-128, 2018.

BALLAS, S. K. *et al.* Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **Sci World J**, v. 2012, p. 949535, 2012.

BANDEIRA, F. *et al.* Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife-PE. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 26, n. 3, p.189-94, 2004.

BAO, B. *et al.* Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. **Transl Res**, v. 152, n. 2, p. 67-80, 2008.

BELINI JUNIOR, E. *et al.* Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells Mol Dis**, v.54, n.4, p.321-327, 2015.

BENCOKOVA, Z. *et al.* ATM activation and signaling under hypoxic conditions. **Mol Cell Bio**, v. 29, n. 2, p. 526-537, 2009.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. Focalização isoelétrica na identificação das hemoglobinas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 3, p. 163-168, 2006.

BOREL, M. J. *et al.* Alterations in basal nutrient metabolism increase resting energy expenditure in sickle cell disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 274, n. 2, p. E357-E364, 1998.

BORGES, H. L.; LINDEN, R.; WANG, J. Y. DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system. **Cell Res**, v. 18, n. 1, p. 17-26, 2008.

BRANDOW, A. M.; ZAPPIA, K. J.; STUCKY, C. L. Sickle cell disease: a natural model of acute and chronic pain. **Pain**, v. 158, n. Suppl 1, p. S79-S84, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**, Brasília, DF: ANVISA, 2002a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2002b. 90p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de educação em saúde: Linha de cuidado em doença falciforme.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, v. 2, 2009. 36p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. **Doença falciforme: o que se deve saber sobre herança genética / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 48 p.**

_____. Ministério da Saúde. **Portaria Conjunta nº 05/SAS/SCTIE/MS, de 18 de fevereiro de 2018.** Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>. Acesso em: 03 de abril de 2019.

BRAWLEY, O. W. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **Ann Intern Med**, v. 148, n. 12, p. 932-938, 2008.

BRISTOW, R. G.; HILL, R. P. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 3, p. 180-192, 2008.

BRUNSON, A. *et al.* Increased risk of leukemia among sickle cell disease patients in California. **Blood**, v. 130, n. 13, p. 1597-1599, 2017.

BUCKLE, A.; PRICE, T.; WHITMORE, D. Exchange and simple transfusion in sickle-cell diseases in pregnancy. **Postgrad Med J**, v. 45, n. 529, p. 722-725, 1969.

BUNN, H. F.; FORGET, B. G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects.** Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1986. 690p.

BURCH, J. S. *et al.* Glutamine via α -ketoglutarate dehydrogenase provides succinyl-CoA for heme synthesis during erythropoiesis. **Blood**, v. 132, n. 10, p. 987-998, 2018.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CABOOT, J. B.; ALLEN, J. L. Hypoxemia in sickle cell disease: significance and management. **Paediat Respir Rev**, v. 15, n. 1, p. 17-23, 2014.

CANÇADO, R. D. *et al.* Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiuréia na doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.

CANVER, M. C.; ORKIN, S. H. Customizing the genome as therapy for the β -hemoglobinopathies. **Blood**, v. 127, n. 21, p. 2536-2545, 2016.

CARIO, H. Hemoglobinopathies: genetically diverse, clinically complex, and globally relevant. **Memo**, v. 11, n. 3, p. 235-240, 2018.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nat**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, 2011.

CARTRON, J.-P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transfus Clin Biol**, v. 15, n. 1-2, p. 39-50, 2008.

CARVALHO, M. O. S. *et al.* Heme concentration as a biomarker of sickle cell disease severity: its role in steady-state and in crisis patients. **Blood**, v. 126, n. 23, p.975, 2015.

CAVALCANTI, J. M. **Doença, Sangue e Raça: o caso da anemia falciforme no Brasil, 1933-1949**. Dissertação (Mestrado em Histórias das Ciências). 2007. 147f. Casa de Oswaldo Cruz –FIOCRUZ, Programa de Pós-Graduação em História das Ciências e da Saúde, Rio de Janeiro, 2007.

CAVAZZANA, M. *et al.* Outcomes of gene therapy for severe sickle disease and beta-thalassemia major via transplantation of autologous hematopoietic stem cells transduced ex vivo with a lentiviral beta AT87Q-globin vector. **Blood**, v. 126, n. 23, p.202, 2015.

CESAR, P. *et al.* Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, v. 12, n. 4, p. 204-210, 2019.

CHAN, M. C. *et al.* Pharmacological targeting of the HIF hydroxylases—a new field in medicine development. **Mol Aspects Med**, v. 47, p. 54-75, 2016.

CHAN, N.; KOCH, C. J.; BRISTOW, R. G. Tumor hypoxia as a modifier of DNA strand break and cross-link repair. **Curr Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 401-410, 2009.

CHEBLOUNE, Y. *et al.* Structural analysis of the 5'flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. **PNAS**, v. 85, n. 12, p. 4431-4435, 1988.

CHINAWA, J. *et al.* Prevalence of hypoxemia among children with sickle cell anemia during steady state and crises: A cross. sectional study. **Niger J Clin Pract**, v.16, n.1, p. 91-95, 2013.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, 2012.

CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of patients with sickle cell disease using transfusion therapy: guidelines and complications. **Hematol Oncol Clin**, v. 30, n. 3, p. 591-608, 2016.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

CLAIBORN, K. David Weatherall wins the 2010 Lasker~ Koshland Special Achievement Award in Medical Research for advances in thalassemia. **J Clin Invest**, v. 120, n. 10, p. 3406-3408, 2010.

CLASTER, S.; VICHINSKY, E. P. Managing sickle cell disease. **BMJ**, v. 327, n. 7424, p. 1151-1155, 2003.

CONNOR JR, J. L. *et al.* Sickle cell anemia and comorbid leg ulcer treated with curative peripheral blood stem cell transplantation. **Int J Lower Ext Wounds**, v.16, n.1, p.56-59, 2017.

CONRAN, N.; TORRES, L. cGMP modulation therapeutics for sickle cell disease. **Exp Biol Med**, v. 244, n. 2, p. 132-146, 2019.

CORDOVIL, K. Sickle Cell Disease: A Genetic Disorder of Beta-Globin. In: AL-ZWAINI, I. (Ed.). **Thalassemia and Other Hemolytic Anemias**. London:IntechOpen, 2018.c.7, p.89-114.

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis**, v. 10, n. 3, p. 149-166, 2007.

CROSBY, M. E. *et al.* MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. **Cancer Res**, v. 69, n. 3, p. 1221-1229, 2009.

CUADRADO, M. *et al.* ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. **J Exp Med**, v. 203, n. 2, p. 297-303, 2006.

DANESE, S. *et al.* Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterol**, v. 130, n. 7, p. 2060-2073, 2006.

DEKKER, L. H. *et al.* Micronutrients and sickle cell disease, effects on growth, infection and vaso-occlusive crisis:A systematic review. **Pediatr Blood Cancer**, v. 9, n.2, p.211-215, 2012.

DI MAGGIO, R. *et al.* Sickle related events following cardiac catheterisation: risk implication for other invasive procedures. **BJH**, v. 185, n. 4, p. 778780, 2019.

DI RAIMONDO, F. *et al.* Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases. **Acta Haematol**, v. 106, n. 4, p. 177-183, 2001.

DRESLER, W.; STEIN, R. Ueber den hydroxylharnstoff. **Justus Liebigs Ann Chem**, v. 150, n. 2, p. 242-252, 1869.

EATON, W. A.; BUNN, H. F. Treating sickle cell disease by targeting HbS polymerization. **Blood**, v. 129, n. 20, p. 2719-2726, 2017.

ELTZSCHIG, H. K.; BRATTON, D. L.; COLGAN, S. P. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 11, p. 852-869, 2014.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **N Engl J Med**, v. 364, n. 7, p. 656-665, 2011.

EMING, S. A.; KRIEG, T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 11, n. 1, p.79-86, 2006.

EMMEL, V. E. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. **Arch Intern Med**, v. 20, n. 4, p. 586, 1917.

ESPACH, Y. *et al.* ATM protein kinase signaling, type 2 diabetes and cardiovascular disease. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 29, n. 1, p. 51-58, 2015.

FARASHI, S.; HARTEVELD, C. L. Molecular basis of α -thalassemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 70, p. 43-53, 2018.

FELDMAN, S. D.; TAUBER, A. I. Sick cell anemia: Reexamining the first" molecular disease". **Bull Hist Med**, v. 71, n. 4, p. 623-650, 1997.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 3, p. 203-208, 2010.

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

FONG, G.-H. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. **Angiogenesis**, v. 11, n. 2, p. 121-140, 2008.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.

FRIEDRISCH, J. R. *et al.* DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 649, n. 1-2, p. 213-220, 2008.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos Moleculares da Anemia Falciforme. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 1, RJ, p. 51-56, 2003.

GARDNER, K. *et al.* Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. **Blood**, v. 128, n. 10, p. 1436-1438, 2016.

GATALICA, Z. *et al.* Renal medullary carcinomas: histopathologic phenotype associated with diverse genotypes. **Hum Pathol**, v. 42, n. 12, p. 1979-1988, 2011.

GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cell Mol Dis**, v. 70, p. 13-42, 2018.

GELPI, A. Migrant populations and the diffusion of the sickle-cell gene. **Ann Intern Med**, v. 79, n. 2, p. 258-264, 1973.

GIRGIS, C. M. *et al.* Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 8, p. 372-380, 2012.

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

GLUCKMAN, E. *et al.* Sick cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 129, n. 11, p. 1548-1556, 2017.

GROSSE, S. D. *et al.* Sick cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. **Am J Prev Med**, v. 41, n. 6, p. S398-S405, 2011.

GUALTIERI, F. *et al.* Hypoxia markers are expressed in interneurons exposed to recurrent seizures. **Neuromolecular Med**, v. 15, n. 1, p. 133-146, 2013.

GÜRKAN, E.; TANRIVERDI, K.; BAŞLAMİŞLİ, F. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor levels in sickle cell disease. **Ann Hematol**, v.84, n.2, p.71-75, 2005.

HALPHEN, I. *et al.* Severe nocturnal and postexercise hypoxia in children and adolescents with sickle cell disease. **PLoS one**, v. 9, n. 5, p. e97462, 2014.

HAMMOND, E. *et al.* The meaning, measurement and modification of hypoxia in the laboratory and the clinic. **Clin Oncol**, v. 26, n. 5, p. 277-288, 2014.

HAMMOND, E. M.; GIACCIA, A. J. The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation. **DNA Repair**, v. 3, n. 8-9, p. 1117-1122, 2004.

HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Pathobiology of sickle cell disease. In: HOFFMAN, R. (Ed.). **Hematology**: Elsevier, 2018.c. 41 p.571-583.

HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M.; NATH, K. A. A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemo-prophylaxis. **Cardiovasc Haematol Disord Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 271-292, 2009.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Arch Intern Med**, v. 6, n. 5, p. 517-521, 1910.

HIROTA, K.; SEMENZA, G. L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 59, n. 1, p. 15-26, 2006.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. **N Engl J Med**, v. 361, n. 15, p. 1475-1485, 2009.

HOFFBRAND, A. V.; STEENSMA, D. P. **Hoffbrand's Essential Haematology**. 8rd ed., Hoboken: John Wiley & Sons, 2019. 421p.

HONIG, G. R.; ADAMS, J. G. **Human Hemoglobin Genetics**. Vienna, Austria: Springer-Verlag, 2012.

HOPPE, C. Prenatal and newborn screening for hemoglobinopathies. **Int J Lab Hematol**, v. 35, n. 3, p. 297-305, 2013.

HSIEH, M. M. *et al.* HIF-prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 2140-2147, 2007.

IAROVAIA, O. *et al.* Genetic and epigenetic mechanisms of β -globin gene switching. **Biochemistry (Mosc)**, v. 83, n. 4, p. 381-392, 2018.

INGRAM, V. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. **Nat**, v. 180, n. 4581, p. 326-328, 1957.

_____. Abnormal human haemoglobins: I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by “fingerprinting”. **Biochim Biophys Acta**, v.28, p. 539-545, 1958.

_____. Sickle-cell anemia hemoglobin: the molecular biology of the first “molecular disease”—the crucial importance of serendipity. **Genetics**, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2004.

JASTANIAH, W. Epidemiology of sickle cell disease in Saudi Arabia. **Ann Saudi Med**, v. 31, n. 3, p. 289, 2011.

JOHNSON, F. L. *et al.* Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. **N Engl J Med**, v. 311, n. 12, p. 780-783, 1984.

JORGE, S. E. *et al.* Hemoglobin: Structure, synthesis and oxygen transport. In: COSTA, F.; CONRAN, N. (eds.). **Sickle Cell Anemia**: Springer, 2016. p.1-22.

JUUL, T. *et al.* The in vivo toxicity of hydroxyurea depends on its direct target catalase. **J Biol Chem**, v. 285, n. 28, p. 21411-21415, 2010.

KAELIN JR, W. G.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Mol Cell**, v. 30, n. 4, p. 393-402, 2008.

KATO, G. J. *et al.* 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, n. 6, p. 2279-2285, 2006.

KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 18010, p. 1-22, 2018.

KAUL, D. K. *et al.* Protective Effect of Fetal Hemoglobin On Inflammation-Induced Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) in Sickle Mice: Microvascular Implications. **Blood**, v. 120, n. 21, p.3250, 2012.

KAUL, D. K. *et al.* Antisickling fetal hemoglobin reduces hypoxia-inducible factor-1 α expression in normoxic sickle mice: microvascular implications. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 304, n. 1, p. H42-H50, 2013.

KAUL, D. K.; HEBBEL, R. P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **J Clin Invest**, v. 106, n. 3, p. 411-420, 2000.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol**, v. 70, n. 5, p. 1469-1480, 2006.

KIM, M. *et al.* Hypoxia-enhanced adhesion of red blood cells in microscale flow. **Microcirculation**, v. 24, n. 5, p. e12374, 2017.

KIMURA, H. *et al.* Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 189-197, 2000.

KROCK, B. L.; SKULI, N.; SIMON, M. C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. **Genes Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1117-1133, 2011.

KULOZIK, A. *et al.* Geographical survey of β s-globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **Am J Hum Genet**, v. 39, n. 2, p. 239-244, 1986.

KUMARESWARAN, R. *et al.* Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability. **J Cell Sci**, v. 125, n. 1, p. 189-199, 2012.

KUROSE, A. *et al.* Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis. **Cytometry A**, v. 69, n. 4, p. 212-221, 2006.

LANZKRON, S. *et al.* An evidence-based review for the NIH consensus development conference on hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Ann Int Med**, v. 148, p. 121-131, 2008.

LAPOUNIÉROULIE, C. *et al.* A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Hum Genet**, v. 89, n. 3, p. 333-337, 1992.

LEHMANN, H.; MARANJIAN, G.; MOURANT, A. Distribution of sickle-cell haemoglobin in Saudi Arabia. **Nat**, v. 198, n. 4879, p. 492-493, 1963.

LESZCZYNSKA, K. B. *et al.* Mechanisms and consequences of ATMIN repression in hypoxic conditions: roles for p53 and HIF-1. **Sci Rep**, v. 6; doi: 10.1038/srep21698 (2016).

LI, X. *et al.* Patient-specific modeling of individual sickle cell behavior under transient hypoxia. **PLoS Comput Biol**, v. 13, n. 3, p. e1005426, 2017.

LIEM, R. I. *et al.* American Society of Hematology 2019 guidelines for sickle cell disease: cardiopulmonary and kidney disease. **Blood Adv**, v. 3, n. 23, p. 3867-3897, 2019.

LIM, C. S. *et al.* Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of the vascular wall. **J Vasc Surg**, v. 58, n. 1, p. 219-230, 2013.

LIU, A. *et al.* Alterations of DNA damage-response genes ATM and ATR in pyothorax-associated lymphoma. **Labor Invest**, v. 85, n. 3, p. 436-446, 2005.

LIU, H. *et al.* Targeted beta-globin gene conversion in human hematopoietic CD34⁺ and Lin⁻CD38⁻ cells. **Gene Ther**, v. 9, n. 2, p. 118-126, 2002.

LOBITZ, S. *et al.* Newborn screening for sickle cell disease in Europe: recommendations from a Pan-European Consensus Conference. **BJH**, v. 183, n. 4, p. 648-660, 2018.

LOPES, F. C. M. *et al.* In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea. **Microvasc Res**, v. 94, p. 106-113, 2014.

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

LUDVIGSEN, F. Hemoglobin synthesis and function. ANNE STIENNE-MARTIN, E.; LOTSPEICH-STEININGER, C. A.; KOEPKE, J. A. (eds). **Clinical Hematology: Principles, Procedures, Correlations**. Philadelphia, New York: Lippincott, 1998. p.73-86.

LUZZATTO, L.; MAKANI, J. Hydroxyurea—An Essential Medicine for Sickle Cell Disease in Africa. **N Engl J Med**, v. 380, p. 187-189, 2019.

MACHOGU, E. M.; MACHADO, R. F. How I treat hypoxia in adults with hemoglobinopathies and hemolytic disorders. **Blood**, v. 132, n. 17, p. 1770-1780, 2018.

MAITRA, P. *et al.* Risk factors for mortality in adult patients with sickle cell disease: a meta-analysis of studies in North America and Europe. **Haematologica**, v.102, n.4, p.626-636, 2017.

MAKANI, J. *et al.* Health policy for sickle cell disease in Africa: experience from Tanzania on interventions to reduce under-five mortality. **Trop Med Intern Health**, v. 20, n. 2, p. 184-187, 2015.

MAKANI, J. *et al.* A ten year review of the sickle cell program in Muhimbili National Hospital, Tanzania. **BMC Hematology**, v. 18, n. 1, p. 18-33, 2018.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. **IUBMB life**, v. 60, n. 2, p. 94-111, 2008.

MANDESE, V. *et al.* Effects of nutritional intake on disease severity in children with sickle cell disease. **Nutr J**, v. 15, n. 1, p. 46, 2015.

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

MARENGO-ROWE, A. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J Clin Pathol**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

MARTINS, G. *et al.* Generation of integration-free iPS cell lines from three sickle cell disease patients from the state of Bahia, Brazil. **Stem Cell Res**, v. 33, p. 10-14, 2018.

MASON, V. R. Sickle cell anemia. **JAMA**, v. 79, n. 16, p. 1318-1320, 1922.

MASOUD, G. N.; LI, W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. **Acta Pharm Sin B**, v. 5, n. 5, p. 378-389, 2015.

MATTE, A. *et al.* New therapeutic options for the treatment of sickle cell disease. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. e2019002, 2019.

MEHER, S. *et al.* Association of plasma homocysteine level with vaso-occlusive crisis in sickle cell anemia patients of Odisha, India. **Ann Hematol**, v. 98, n. 10, p. 2257-2265, 2019.

- MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bull World Health Org**, v. 86, p. 480-487, 2008.
- MONTEIRO, A. C. B.; IANO, Y.; FRANÇA, R. P. General Aspects of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Sickle Cell Disease. In: IANO, Y. *et al.* (eds) **Proceedings of the 3rd Brazilian Technology Symposium**. Campinas: Springer, 2017. p.311-318.
- MORRIS, C. R. *et al.* Acquired amino acid deficiencies: a focus on arginine and glutamine. **Nutr Clin Pract**, v. 32, p. 30S-47S, 2017.
- MUÑOZ-CHÁPULI, R. Evolution of angiogenesis. **Int J Dev Biol**, v.55, n.4-5, p.345-351, 2011.
- NAIK, R. P.; HAYWOOD, C. Sickle cell trait diagnosis: clinical and social implications. **ASH Educ Program**, v. 2015, n. 1, p. 160-167, 2015.
- NAOUM, P. **Eletroforese-Técnicas e Diagnóstico**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1999. 154 p.
- NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 22, n. 1, p. 5-22, 2000.
- NASCIMENTO-JR, N. M.; MELO, T. R. F. Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Híbridos para o Tratamento dos Sintomas da Anemia Falciforme. **Rev Virt Quim**, v. 3, n. 6, p. 447-451, 2012.
- NATH, B.; SZABO, G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. **Hepatology**, v. 55, n. 2, p. 622-633, 2012.
- NEMETH, N.; FURKA, I.; MIKO, I. Hemorheological changes in ischemia-reperfusion: an overview on our experimental surgical data. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 57, n. 3, p. 215-225, 2014.
- NEVITT, S.; JONES, A.; HOWARD, J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. **Cochrane Database Syst Rev**. 2017, 4. Art. n.: CD002202.
- NIHARA, Y. *et al.* L-glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. **BMC Hematology**, v. 5, n. 4, p. 4, 2005.
- NIHARA, Y. *et al.* A phase 3 trial of l-glutamine in sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 379, n. 3, p. 226-235, 2018.
- NILLESEN, S. T. *et al.* Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1123-1131, 2007.
- ODIÈVRE, M.-H. *et al.* Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res**, v. 134, n. 4, p. 532-537, 2011.

OLCINA, M.; LECANE, P. S.; HAMMOND, E. M. Targeting hypoxic cells through the DNA damage response. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 23, p. 5624-5629, 2010.

ORTMANN, B.; DRUKER, J.; ROCHA, S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 18, p. 3569-3582, 2014.

PANTE-DE-SOUSA, G. *et al.* Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genet Mol Biol**, v. 21, n. 4, p. 427-430, 1998.

PAPAGEORGIOU, D. P. *et al.* Simultaneous polymerization and adhesion under hypoxia in sickle cell disease. **PNAS**, v. 115, n. 38, p. 9473-9478, 2018.

PAREDES, B. D. *et al.* Generation of three control iPS cell lines for sickle cell disease studies by reprogramming erythroblasts from individuals without hemoglobinopathies. **Stem Cell Res**, v. 38, 101454, 2019.

PAULING, L. *et al.* Sickle cell anemia, a molecular disease. **Sci**, v. 110, n. 2865, p. 543-548, 1949.

PEDROSA, A. M. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia.** 2013. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2013.

PEDROSA, A. M. *et al.* Cytotoxicity and DNA damage in the neutrophils of patients with sickle cell anaemia treated with hydroxyurea. **Braz J Pharm Sci**, v. 50, n.2, p. 401-410, 2014.

PELIZARO, B. I. *et al.* Hydroxyurea in the sickle cell anemia: toxicity and effectiveness. **JNUOL**. v. 6, n. 8, p. 1864-1870, 2012.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. **Colomb Med**, v. 36, n. 3, p. 215-226, 2005.

PERUTZ, M. F. *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5-5Å resolution obtained by x-ray analysis. **Nat**, v.185, p.416-422, 1960.

PHILIPSEN, S.; HARDISON, R. C. Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements. **Blood Cell Mol Dis**, v. 70, p. 2-12, 2018.

PICCIN, A. *et al.* Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **Eur J Haematol**, v. 102, n. 4, p. 319-330, 2019.

PIEL *et al.* Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010–2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. **PLoS Med**, v. 10, n. 7, p. e1001484, 2013.

PIEL; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 376, n. 16, p. 1561-1573, 2017.

PIEL, F. B. The present and future global burden of the inherited disorders of hemoglobin. **Hematol Oncol Clin**, v. 30, n. 2, p. 327-341, 2016.

PIRES, I. M. *et al.* Exposure to acute hypoxia induces a transient DNA damage response which includes Chk1 and TLK1. **Cell Cycle**, v. 9, n. 13, p. 2502-2507, 2010a.

PIRES, I. M. *et al.* Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability. **Cancer Res**, v. 70, n. 3, p. 925-935, 2010b.

POLI, M. C.; ORANGE, J. CRISPR/Cas9 β -globin Gene Targeting in Human Haematopoietic Stem Cells. **Pediatr**, v. 140, n. Supplement 3, p. S226-S227, 2017.

POWARS, D. *et al.* Pneumococcal septicemia in children with sickle cell anemia: changing trend of survival. **JAMA**, v. 245, n. 18, p. 1839-1842, 1981.

QUATTRONE, F. *et al.* Cutaneous ulcers associated with hydroxyurea therapy. **J Tissue Viability**, v. 22, n. 4, p. 112-121, 2013.

QUINN, C. T. l-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers. **Blood**, v. 132, n. 7, p. 689-693, 2018.

QUINN, N. L. *et al.* Genomic organization and evolution of the Atlantic salmon hemoglobin repertoire. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 539, 2010.

RAMALHO, A. **As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil**. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética, 1986.

REES, D.; GIBSON, J. Biomarkers in sickle cell disease. **BJH**, v. 156, n. 4, p. 433-445, 2012.

RIBEIL, J.-A. *et al.* Gene therapy in a patient with sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 376, n. 9, p. 848-855, 2017.

ROBITAILLE, N.; DELVIN, E. E.; HUME, H. A. Newborn screening for sickle cell disease: a 1988–2003 Quebec experience. **Paediatr Child Health**, v. 11, n. 4, p. 223-227, 2006.

RODRIGUES, M. *et al.* Expression Pattern of HIF-1 α and VEGF Supports Circumferential Application of Scatter Laser for Proliferative Sickle Retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 57, p. 6739-6746, 2016.

SANTOS, J. L. *et al.* Mutagenic and genotoxic effect of hydroxyurea. **Int J Biomed Sci**, v. 7, n. 4, p. 263-267, 2011.

SANTOS, J. L. D. Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 6, p. 489-490, 2010

SARAF, S. L. *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation with alemtuzumab/low-dose irradiation to cure and improve the quality of life of adults with sickle cell disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 22, n. 3, p. 441-448, 2016.

- SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.
- SCHNOG, J. *et al.* Sickle cell disease; a general overview. **Neth J Med**, v. 62, n. 10, p. 364-74, 2004.
- SEBASTIANI, P. *et al.* A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2727-2735, 2007.
- SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721-732, 2003.
- _____. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. **Blood**, v. 114, n. 10, p. 2015-2019, 2009.
- _____. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 47-71, 2014.
- SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cell Mol Dis**, v. 70, p. 66-77, 2018.
- SETTY, B. Y. *et al.* Hypoxaemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. **Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1450-1455, 2003.
- SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 28, n. 2, p.144-148, 2006.
- SIMONS, M. *et al.* Comparison of the oxidative reactivity of recombinant fetal and adult human hemoglobin: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. **Biosci Rep**, v. 38, n. 4, p. BSR20180370, 2018.
- SMITH, A. W. *et al.* Improving Uptake of Hydroxyurea in Patients with Sickle Cell Disease: A Retrospective Study of a Clinic-based Change in Consenting Practices. **J Nat Med Assoc**, v. 111, n. 2, p. 169-175, 2018.
- SOUZA, J. M. *et al.* Fisiopatologia da anemia falciforme. **Rev Transformar**, v. 8, n. 8, p. 162-178, 2016.
- STEINBERG, M.; NAGEL, R. New and recombinant mutant hemoglobins of biological interest. In: STEINBERG, M. *et al.* (eds.). **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 1195-1211.
- STEINBERG, M. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **Sci World J**, v.8, p. 1295-1324, 2008.

_____. Overview of sickle cell anemia pathophysiology. In: COSTA, F., CONRAN, N. (eds). **Sickle Cell Anemia: from basic science to clinical practice**. Switzerland: Springer, 2016. p.49-73.

STEVENS, M. Hydroxyurea: an overview. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 13, n. 3, p. 172-175, 1999.

STREETLY, A. *et al.* Implementation of universal newborn bloodspot screening for sickle cell disease and other clinically significant haemoglobinopathies in England: screening results for 2005–7. **J Clin Pathol**, v. 62, n. 1, p. 26-30, 2009.

STUART, M. J.; NAGEL, R. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p.1343-1360, 2004.

SUN, K.; XIA, Y. New insights into sickle cell disease: a disease of hypoxia. **Curr Opin Hematol**, v. 20, n. 3, p. 215-221, 2013.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu Rev Pathol**, v. 14, p. 263-292, 2019.

SWARTZ, M. A. *et al.* Renal medullary carcinoma: clinical, pathologic, immunohistochemical, and genetic analysis with pathogenetic implications. **Urol**, v. 60, n. 6, p. 1083-1089, 2002.

TALIAFERRO, W. H.; HUCK, J. G. The inheritance of sickle-cell anaemia in man. **Genetics**, v. 8, n. 6, p. 594-598, 1923.

TAN, F. *et al.* Diametric effects of hypoxia on pathophysiology of sickle cell disease in a murine model. **Exp Biol Med**, v. 241, n. 7, p. 766-771, 2016.

TANAKA, T.; NANGAKU, M. Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): prolyl-hydroxylase inhibitors to activate hypoxia-inducible factor (HIF) as a novel therapeutic approach in CKD. **J Pharmacol Sci**, v. 109, n. 1, p. 24-31, 2009.

TELEN, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 810-819, 2016.

TELEN, M. J.; MALIK, P.; VERCELLOTTI, G. M. Therapeutic strategies for sickle cell disease: towards a multi-agent approach. **Nat Rev Drug Discov**, v. 18, p. 139-158, 2018.

TEWARI, S. *et al.* Environmental determinants of severity in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p. 1108-1116, 2015.

THEIN, S. L. Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. **Blood Cell Mol Dis**, v. 70, p. 54-65, 2018.

THIELE, J. *et al.* Vascular architecture and collagen type IV in primary myelofibrosis and polycythaemia vera: an immunomorphometric study on trephine biopsies of the bone marrow. **BJH**, v. 80, n. 2, p. 227-234, 1992.

TORRES, F. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinas humanas-hipótese malária ou efeito materno. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2005.

TORRES, L.; CONRAN, N. Emerging pharmacotherapeutic approaches for the management of sickle cell disease. **Expert Opin Pharmacother**, v. 20, n. 2, p. 173-186, 2019.

TRAEGER-SYNODINOS, J. Pre-implantation genetic diagnosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 39, p. 74-88, 2017.

TRAEGER-SYNODINOS, J. *et al.* EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. **Eur J Hum Genet**, v. 23, n. 4, p. 426-437, 2015.

TSHILOLO, L. *et al.* Hydroxyurea for Children with Sickle Cell Anemia in Sub-Saharan Africa. **N Engl J Med**, v. 380, n. 2, p. 121-131, 2019.

TURGEON, M. L. **Clinical hematology: theory and procedures 5th edn.** Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2012. p. 307-341.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. research0034.1-0034.11, 2002.

VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobin. **Am J Clin Pathol**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.

VICHINSKY, E. *et al.* Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. **Pediatr**, v. 81, n. 6, p. 749-755, 1988.

VOON, H. P. J.; VADOLAS, J. Controlling α -globin: a review of α -globin expression and its impact on β -thalassemia. **Haematologica**, v. 93, n. 12, p. 1868-1876, 2008.

WAILOO, K. "A disease sui generis": the origins of sickle cell anemia and the emergence of modern clinical research, 1904-1924. **Bull Hist Med**, v. 65, n. 2, p. 185-208, 1991.

WAINSCOAT, J. *et al.* Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. **Mol Biol Med**, v. 1, n. 2, p. 191-197, 1983.

WALTERS, M. C. *et al.* Indications and results of HLA-identical sibling hematopoietic cell transplantation for sickle cell disease. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 22, n. 2, p. 207-211, 2016.

WARE, R. *et al.* Sickle cell disease. **Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311-323, 2017.

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

WATSON, J.; STAHRMAN, A. W.; BILELLO, F. P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. **Obstet Gynecol Surv**, v. 3, n. 6, p. 819-820, 1948.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull World Health Organ**, v. 79, p. 704-712, 2001.

WEATHERALL, D. J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 4, p. 245-255, 2001.

_____. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4331-4336, 2010.

WEBER, L. *et al.* An optimized lentiviral vector efficiently corrects the human sickle cell disease phenotype. **Mol Ther Methods Clin Dev**, v. 10, p. 268-280, 2018.

WHO Working Group. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis, and treatment. WHO working group. **Bull World Health Organ**, v. 60, n. 5, p. 643-660, 1982.

WIENERT, B. *et al.* Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. **Trends Genet**, v. 34, n. 12, p. 927-940, 2018.

WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S.; BEXELL, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. **Pharmacol Ther**, v. 164, p. 152-169, 2016.

WU, Z. H.; MIYAMOTO, S. Induction of a pro-apoptotic ATM–NF- κ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress. **EMBO J**, v.27, n.14, p.1963-1973, 2008.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004, 1081p.

ZEMEL, B. S. *et al.* Effects of delayed pubertal development, nutritional status, and disease severity on longitudinal patterns of growth failure in children with sickle cell disease. **Pediat Res**, v. 61, n. 5, p. 607-613, 2007.

ZHANG, X. *et al.* Hypoxic response contributes to altered gene expression and precapillary pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease. **Circulation**, v. 129, n. 16, p. 1650-1658, 2014.

ZHOU, B.-B. S.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nat**, v. 408, n. 6811, p. 433-439, 2000.

ZIELLO, J. E.; JOVIN, I. S.; HUANG, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **Yale J Biol Med**, v. 80, n. 2, p. 51-60, 2007.

ZIVOT, A. *et al.* Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. **Mol Med**, v. 24, n. 1, p. 11, 2018.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****PROJETO: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS À HIPÓXIA EM
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO
TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA****NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO**

A **anemia falciforme** é uma doença genética (transmitida dos pais para os filhos), caracterizada pela presença da hemoglobina S (falciforme), que, sob condições de baixa oxigenação, altera a forma das hemácias e provoca sérios danos ao paciente, como crises dolorosas de vaso-oclusão, anemia, AVC e falência de diversos órgãos.

Sabe-se que a hipóxia (baixa concentração de oxigênio) é considerada o estímulo iniciador da falcização das hemácias e também é uma grave consequência que pode gerar inúmeros outros danos ao paciente, como alterações da expressão de diversos genes, alterações na estrutura do DNA, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), baixa imunidade e inflamações constantes. A hipóxia também pode interferir ou influenciar no prognóstico e tratamento dos pacientes.

Esta pesquisa tem o objetivo de investigar a expressão dos genes *HIF-1 α* , *VEGF*, *ATM* e *ATR* em pacientes com anemia falciforme, associando esses genes com o tratamento e clínica do paciente. Os resultados da pesquisa nos ajudarão a ter uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, contribuindo para o desenvolvimento de um melhor manejo da terapia, visando diminuir ou mesmo evitar muitas das manifestações clínicas da doença, bem como auxiliar na terapia farmacológica do paciente.

Por este motivo, você está sendo convidado (a) a participar deste estudo de forma voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tal, necessitamos sua autorização para a coleta de amostras de sangue. As coletas de sangue serão realizadas no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio e serão usadas apenas para este fim. Sua participação nesta pesquisa não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa ou leve desconforto temporário no local da picada da coleta de sangue.

- Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não será revelada nenhuma informação que permita identificar os pacientes, em hipótese alguma.

- Cada paciente é livre para decidir não participar.

- O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa, e sem prejuízo de sua assistência médica.

- A divulgação dos resultados será totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes

Em caso de dúvidas ou necessidade de esclarecimentos, você poderá comunicar-se com os pesquisadores, aqui representado por ALANO MARTINS PEDROSA, com endereço de contato: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Rodolfo Teófilo – CEP 60430-370, Faculdade de Farmácia/UFC. Fone: (85) 3366 8058 / 3366 8264.

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Assinatura do paciente ou do responsável legal: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Fortaleza, _____ de _____ de 201__.

**APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA DE ESTUDO E ACOMPANHAMENTO DO
PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME**



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

**FICHA CLÍNICA DE ESTUDO E ACOMPANHAMENTO DO PACIENTE COM
ANEMIA FALCIFORME**

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nº prontuário.: _____

Origem: _____

Nome completo: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () M () F

Identidade (nº): _____

Endereço completo: _____

Referência: _____

Cidade: _____ UF: _____

Telefone: _____ Celular: _____

e-mail: _____

- Etnia:

() Nenhuma () Branco () Afrodescendente () Índio () Pardo

- Deficiência:

() Nenhuma () Auditiva () Visual () Física () Dislexia () Múltipla

2. DIAGNÓSTICO E EXAMES

2.1. Data do diagnóstico: _____

2.2. Concentração de HbF ao diagnóstico: _____

2.3. Eletroforese de hemoglobina: _____

2.4. HPLC: _____

2.5. Hemograma:

(Obs.: anotar qual a dosagem de HU que estava tomando na época do hemograma)

DATA	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Dosagem de HU									
Hemácias									
Hb									
Ht									
VCM									
HCM									
CHCM									
RDW									
Leucócitos									
Bast									
Seg									
Eos									
Baso									
Linf									
Mon									
Meta									
Mielo									
Prom									
Blas									
Plaquetas									
Reticulócitos									

3. DADOS CLÍNICOS

Ano/ Frequência									
Crises Dolorosas *									
CVO									
AVC									
Priapismo									
Crise Aplástica									
Sínd. Torácica Aguda									
Sequestro Esplênico									
Úlceras nas Pernas									
Necrose óssea									
Osteomielite									
Transfusões sanguíneas									
Infecções recorrentes									
Internações									

Data da última transfusão: ____/____/____

Data da última internação: ____/____/____

Principais infecções com datas: _____

