



Lidiane de Souza Torres

**Polimorfismos genéticos e expressão de marcadores envolvidos em
processos inflamatórios, angiogênicos e de hipóxia na doença falciforme**

Lidiane de Souza Torres

Polimorfismos genéticos e expressão de marcadores envolvidos em processos inflamatórios, angiogênicos e de hipóxia na doença falciforme

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto-SP.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini
Domingos

Coorientadora: Profa. Dra. Sonia Maria Oliani

Lidiane de Souza Torres

Polimorfismos genéticos e expressão de marcadores envolvidos em processos inflamatórios, angiogênicos e de hipóxia na doença falciforme

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto-SP.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari
FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto
UNICAMP – Campinas

Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum
Instituto Naoum de Hematologia – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto – SP
26 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Valdete, a quem agradeço pela vida e pelo amor que incondicionalmente dedicaram a mim, por todos os ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal, pela paciência, pela confiança, por estarem ao meu lado em todos os momentos importantes, por acreditarem em mim e por todo apoio às minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Doutorado concedida (processo nº 2012/19653-1).

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pela oportunidade, pela paciência e pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho. Por todos os ensinamentos, desde a minha iniciação científica, que proporcionaram o meu crescimento pessoal e profissional e, acima de tudo, o meu interesse pela pesquisa. Sou grata pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e pelos desafios e responsabilidades que pôs a minha frente.*

*À minha coorientadora, **Profa. Dra. Sonia Maria Oliani**, por ter aberto as portas do seu Laboratório para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa. Por ter acreditado e confiado na minha ideia, e por toda a assistência científica na interpretação e discussão dos resultados. Sou muito grata pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela considerável contribuição ao meu estudo.*

*Ao **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida**, por permitir a minha presença em seu laboratório durante muitas análises e por sempre se mostrar interessado e disposto a ajudar.*

*À **Clarisse Lobo**, pela participação e contribuição em todas as discussões e elaboração de manuscritos.*

*À **Kallyne Mimura**, pela disponibilidade em me auxiliar nas análises, pelos ensinamentos e pela preocupação que demonstrou pelo desenvolvimento da minha pesquisa.*

Ao meu grande amigo, **Gabriel Gandolphi**, pela amizade sincera e que não perde força, apesar da distância física, e por toda a ajuda na revisão dos manuscritos originados desse estudo.

Aos amigos do grupo de pesquisa, que muito contribuíram para a realização deste trabalho. **Danilo Grünig, Édis Belini, Jéssika Okumura, Patrícia Nascimento e Renan Garcia**, vocês foram imprescindíveis para que esse estudo se tornasse possível. Obrigada por dedicarem parte do tempo de vocês para me auxiliarem. Agradeço o apoio e, principalmente, a amizade.

Às minhas amigas, **Gisele Carrocini e Larissa Venancio**, que acompanharam de perto o meu caminho até aqui e me ajudaram sempre em tudo o que foi preciso. Tenho-as como minhas irmãs. Obrigada pela amizade e pelo companheirismo, dentro e fora do laboratório.

Ao meu namorado, **Fábio Grecco**, pelo companheirismo, pelo apoio e pelo incentivo. Agradeço por ter participado dessa etapa, ser meu porto seguro e ter me dado a força que eu precisava para seguir em frente. Obrigada pela paciência, por acreditar em mim e por torcer pelo meu sucesso. Muito não teria sido possível sem o seu apoio, compreensão, amor e amizade.

Aos amigos que passaram pelo LHGDH e participaram dessa importante etapa na minha vida. **Camila Zucchini, Daniel Santos, Gabriela Martins, Gustavo Capatti, Isabela Chinelato, Izabella Tambones, Jéssica Bacchi, Letícia Sybuia, Lucas Ramos, Luis Felipe, Mariana Salvarani, Mayk Santos, Nathalia Rossigalli, Nayara Chaves, Tiago Lucena, Vanessa Cardoso, Vanessa Urbinatti, Vinícius Gobbe e Willian Barberino**, agradeço pela amizade, pelas conversas e pelos momentos de diversão. A companhia de vocês fez toda a diferença durante esse período; é muito mais gratificante trabalhar quando estamos rodeados de pessoas tão queridas como vocês. Obrigada por tudo.

Aos amigos valiosos, que sempre se fizeram presentes, acompanhando e incentivando minha jornada, **Cássio Fogarin, Kaio Chaboli, João Pitot, Mizael Ferreira, Raul Cardozo, Tamiris Viana e Yuri Grandinete.**

Às minhas grandes companheiras de república nesse tempo, **Andréia Felício, Eduarda Ciscato, Paula Rosa e Renata Prandini.** A convivência nos tornou mais próximas e sou muito grata pela amizade construída. Vocês acompanharam de perto meus momentos de força e fraqueza, e sempre me deram muito apoio. Obrigada!

Aos meus tios **Natalino Sabino, Neide Sabino, Maria Vanilda e Vanda Souza.** À minha prima querida, **Daniele Santos.** Aos meus sogros **Pedro Caressato e Yone Grecco.** Muito obrigada! Por todo o apoio e por estarem sempre torcendo por mim. Vocês sempre foram e serão o meu alicerce; agradeço a Deus por ter vocês em minha vida.

Aos amigos **Anderson Ferris, Carlos Mow, Dayane Prates, Erick Bassi, Guilherme Scagion, Ivã Lopes, Kamila Pereira, Karen Castillioni, Lara Zácari, Luciane Barcelos, Júlia Montineri, Matheus Nhoato, Rafael Graciani e Vinícius Armelin,** agradeço a amizade, as conversas e os momentos de descontração.

A todos os professores e amigos da graduação e pós-graduação, pelo convívio e aprendizado.

Agradeço, finalmente, a **Deus,** pela fé que me mantém viva. “Você não precisa acreditar no impossível, você só precisa ter fé e acreditar em Deus.” (Ana Carolina).

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A doença falciforme (DF) é uma anemia hemolítica hereditária causada pela presença da hemoglobina S (Hb S). No Brasil, as formas mais comuns são a homozigose (Hb SS) e a associação da Hb S com as hemoglobinas C (Hb SC), D-Punjab (Hb SD) e beta-talassemia (Hb S β -tal). A inflamação na DF é uma condição crônica, com constante liberação de citocinas pró-inflamatórias, e relacionada aos eventos de hipóxia e angiogênese, também característicos da doença. O comportamento desses eventos nos genótipos da DF podem explicar as variações frequentemente encontradas nas manifestações clínicas da doença nos indivíduos. Assim, o objetivo desse estudo foi analisar os processos de inflamação, hipóxia e angiogênese nos genótipos Hb SS, Hb SD, Hb S β -tal e Hb SC da DF, comparando os resultados obtidos com um grupo controle sem hemoglobinopatias. Inicialmente, o perfil hemolítico dos indivíduos com DF foi avaliado, considerando-se a porcentagem de reticulócitos e os níveis de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubina indireta (BI). O perfil inflamatório foi avaliado pela quantificação dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), proteínas anti-inflamatórias (TGF- β 1 e ANXA1), fatores responsivos à hipóxia (HIF-1 α e VEGF) e polimorfismos genéticos capazes de influenciar nas vias estudadas. A porcentagem de reticulócitos e os níveis de LDH, AST e BI foram mais elevados no genótipo Hb SS, seguido pelo genótipo Hb SD, enquanto os grupos com Hb S β -tal e Hb SC apresentaram perfil hemolítico mais brando. Os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios IL-1 β , IL-8, TNF- α e TGF- β 1 foram aumentados na DF em relação ao controle, especialmente no genótipo Hb SS, evidenciando a inflamação presente e mais grave no grupo com maior intensidade hemolítica. A ANXA1 esteve reduzida na DF, refletindo o desequilíbrio entre a propagação da resposta inflamatória e resolução da inflamação. No entanto, dentre os genótipos, a ANXA1 foi mais elevada no grupo com Hb SS, sugerindo sua externalização como um mecanismo compensatório na tentativa de resolução do quadro inflamatório nesse grupo de maior gravidade. O HIF-1 α também apresentou níveis plasmáticos superiores no grupo com DF, porém, sem distinção entre os genótipos, enquanto o VEGF não teve seus níveis elevados na DF, mas foi influenciado por polimorfismos em seu gene. Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a inflamação é uma condição presente em todos os genótipos da DF, com intensidade variável e dependente da gravidade da

doença, sendo maior em indivíduos com Hb SS e Hb SD, e relacionada, também, aos processos de hipóxia e angiogênese.

Palavras-chave: citocina, inflamação, anti-inflamação, angiogênese, hipoxemia, anemia falciforme, hemólise.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a hereditary hemolytic anemia caused by the presence of hemoglobin S (Hb S). In Brazil, the most common forms of SCD are the homozygous (Hb SS) and the association of Hb S with hemoglobins C (Hb SC), D-Punjab (Hb SD) and beta thalassemia (Hb S β -thal). Inflammation in SCD is a chronic condition, with the recurrent release of pro-inflammatory cytokines, and is related to hypoxic and angiogenic events, which are characteristics of the disease. The behavior of these events in SCD genotypes could explain variations frequently found in the clinical manifestations of patients. Thus, the aim of the study was to verify the inflammation, hypoxia and angiogenesis processes in the Hb SS, Hb SD, Hb S β -thal and Hb SC genotypes of SCD, comparing the results to a control group without hemoglobinopathies. At first, the hemolytic profile of SCD individuals was evaluated considering the reticulocytes percentage and the lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), and indirect bilirubin (IB) levels. The inflammatory profile was analyzed by quantifying the plasma levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, and TNF- α), anti-inflammatory proteins (TGF- β 1 and ANXA1), responsive factors to hypoxia (HIF-1 α and VEGF), and genetic polymorphisms able to influence the studied pathways. The percentage of reticulocytes and the LDH, AST, and IB levels were higher in the Hb SS genotype, followed by Hb SD, while the Hb S β -thal and Hb SC genotypes presented milder hemolytic profile. The plasma levels of inflammatory markers IL-1 β , IL-8, TNF- α , and TGF- β 1 were higher in SCD than in the control group, especially in the Hb SS genotype, demonstrating the presence of more severe inflammation in the group with greater hemolytic intensity. The ANXA1 was reduced in SCD, reflecting the imbalance between inflammatory response propagation and inflammation resolution, however, among the genotypes, ANXA1 was increased in the Hb SS group, suggesting its externalization as a compensatory mechanism for the resolution of inflammation in this group with greater clinical and inflammatory severity. HIF-1 α also presented higher plasma levels in the SCD group, however, without distinction between the genotypes, while the plasma levels of VEGF were not increased in SCD, they are influenced by polymorphisms in its gene. With the obtained results, we conclude that inflammation is a present condition in all SCD genotypes with variable intensity and

dependent upon the disease severity, which is higher in the Hb SS and Hb SD forms, and also related to the hypoxic and angiogenic processes.

Keywords: cytokine, inflammation, anti-inflammation, angiogenesis, hypoxemia, sickle cell anemia, hemolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1.** Oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e padrão de restrição observados nas análises moleculares por PCR-RFLP para identificação das mutações de Hb S, Hb C e Hb D. 63
- Quadro 2.** Oligonucleotídeos iniciadores e fragmentos amplificados observados nas análises moleculares por PCR-AE para identificação das mutações de beta talassemia CD39, IVS-I-1, IVS-I-6 e IVS-I-110. 63
- Quadro 3.** Oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e padrão de restrição observados nas análises moleculares por PCR-RFLP, para identificação dos polimorfismos avaliados no estudo. 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos principais membros das famílias gênicas das globinas.	30
Figura 2. Ontogenia das cadeias de globina: representação esquemática da expressão das principais cadeias ao longo do desenvolvimento.	31
Figura 3. Distribuição geográfica do alelo <i>HBB^S</i>	33
Figura 4. Mecanismos hipotéticos dos subfenótipos clínicos da DF.	36
Figura 5. Papel da inflamação no processo vaso-oclusivo da DF.	38
Figura 6. Ações da IL-1 β na inflamação.	40
Figura 7. Papel do TNF- α na disfunção vascular.	42
Figura 8. Representação esquemática da ação dos mediadores e componentes celulares relacionados com a inflamação e a resolução da inflamação.	43
Figura 9. Ação da anexina durante mecanismos de isquemia-reperfusão.	45
Figura 10. Principal via de sinalização do TGF- β	46
Figura 11. Principais efeitos do TGF- β nas células do sistema imune.	47
Figura 12. Regulação do HIF em normóxia e hipóxia.	49
Figura 13. A expressão de VEGF é induzida pela hipóxia.	51
Figura 14. Hipótese para a relação existente entre as vias de inflamação, hipóxia e angiogênese na DF.	53

Figura 15. Distribuição genotípica (número de indivíduos; porcentagem) das amostras de pessoas com DF, do total de 1254 amostras avaliadas.	64
Figura 16. Distribuição genotípica (número de indivíduos; porcentagem) da DF nos indivíduos selecionados para o grupo de estudo.	65
Figura 17. Comparações dos marcadores hemolíticos entre os grupos de estudo com DF	73
Figura 18. Comparações dos níveis plasmáticos dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese entre os genótipos da DF.	79
Figura 19. Comparação dos valores apresentados na quantificação de glóbulos brancos (A), neutrófilos (B) e plaquetas (C) entre os genótipos da DF.	80
Figura 20. Níveis plasmáticos de VEGF nos genótipos do polimorfismo -2578C/A (VEGFA), no grupo com Hb SS.	84
Figura 21. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo controle sem hemoglobinopatias.	87
Figura 22. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo com DF.	91
Figura 23. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α no grupo com DF.	96
Figura 24. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de TNF- α e HIF-1 α	96
Figura 25. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de TNF- α e VEGF.	96
Figura 26. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-8.	97

Figura 27. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e TGF- β 1 no grupo com DF:	97
Figura 28. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e VEGF.	97
Figura 29. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-8 e TGF- β 1 no grupo com DF.	98
Figura 30. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-8 e VEGF.	98
Figura 31. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de ANXA1 e TGF- β 1 no grupo com DF.	98
Figura 32. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de ANXA1 e VEGF no grupo com DF.	99
Figura 33. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de HIF-1 α e VEGF no grupo com DF.	99
Figura 34. Análise dos parâmetros relacionados à ocorrência de retinopatia proliferativa na DF.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das amostras incluídas nos grupos de estudo, bem como as concentrações médias das frações de hemoglobina presentes em cada genótipo.	66
Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos índices hematológicos e bioquímicos obtidos do hemograma dos pacientes com DF.	67
Tabela 3. Influência da idade e do sexo nos marcadores de hemólise.	74
Tabela 4. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos -511C/T (<i>IL1B</i>), -251A/T (<i>IL8</i>), -308G/A (<i>TNFA</i>) e -511C/T (<i>TGFB1</i>), relacionados à via inflamatória, no grupo controle e nos genótipos da DF.	76
Tabela 5. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos 1772C/T (<i>HIF1A</i>), 1790G/A (<i>HIF1A</i>) e -2578C/A (<i>VEGFA</i>), relacionados às vias de hipóxia e angiogênese, no grupo controle e nos genótipos da DF.	77
Tabela 6. Comparação dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias e dos fatores de hipóxia e angiogênese entre o grupo controle e o grupo com DF.	78
Tabela 7. Valores de p para as análises de associação entre os níveis das citocinas inflamatórias e os polimorfismos em seus respectivos genes, nos diferentes modelos de herança genética.	82
Tabela 8. Valores de p para as análises de associação entre os níveis dos marcadores de hipóxia e angiogênese e os polimorfismos em seus respectivos genes, nos diferentes modelos de herança genética.	83
Tabela 9. Resultado detalhado da análise de associação entre os níveis plasmáticos de VEGF (pg/mL) e o polimorfismo -2578C/A (<i>VEGFA</i>), nos modelos de herança codominante, dominante e sobredominante.	83

Tabela 10. Resultado da análise de ANOVA <i>fatorial</i> para a influência dos polimorfismos genéticos e da DF, simultaneamente, nos valores plasmáticos médios dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese.	84
Tabela 11. Resultado da análise de ANOVA <i>fatorial</i> para a influência dos polimorfismos genéticos e dos genótipos da DF, simultaneamente, nos valores médios plasmáticos dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese.	85
Tabela 12. Resultados das correlações significantes encontradas entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese, no grupo controle e na DF.	95
Tabela 13. Distribuição da ocorrência das manifestações fenotípicas STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.	100
Tabela 14. Comparações estatísticas entre os genótipos da DF em decorrência da presença ou ausência de STA e retinopatia proliferativa.	101
Tabela 15. Prevalência do polimorfismo -511C/T (<i>IL1B</i>) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.	103
Tabela 16. Prevalência do polimorfismo -251A/T (<i>IL8</i>) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.	104
Tabela 17. Prevalência do polimorfismo -308G/A (<i>TNFA</i>) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.	105
Tabela 18. Prevalência do polimorfismo -509C/T (<i>TGFB1</i>) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.	106
Tabela 19. Prevalência do polimorfismo -1772C/T (<i>HIF1A</i>) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.	107

Tabela 20. Prevalência do polimorfismo -2578C/A (*VEGFA*) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF. 108

Tabela 21. Comparações dos valores médios plasmáticos dos marcadores avaliados nos grupos com DF na presença ou ausência de STA. 109

Tabela 22. Comparações dos valores médios plasmáticos dos marcadores avaliados nos grupos com DF na presença ou ausência de retinopatia proliferativa. 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variâncias
ANXA1	Anexina A1 (proteína)
<i>ANXA1</i>	Anexina A1 (gene)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AVE	Acidente Vascular Encefálico
β -tal	Beta-talassemia
β^0 -tal	Beta zero - talassemia
β^+ -tal	Beta mais - talassemia
BD	Bilirrubina direta (ou conjugada)
BI	Bilirrubina indireta (ou não-conjugada)
BT	Bilirrubina total
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CD39	mutação no códon 39 do gene beta
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
COX-2	ciclo-oxigenase-2
DF	Doença Falciforme
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Eritropoietina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GWAS	Estudos de Associação de Genomas Amplos
<i>HBA1</i>	gene Alfa 1

<i>HBA2</i>	gene alfa 2
<i>HBA1P</i>	pseudogene alfa 1
<i>HBA2P</i>	pseudogene alfa 2
<i>HBBP</i>	pseudogene beta
<i>HBB</i>	gene beta
<i>HBD</i>	gene delta
<i>HBE</i>	gene épsilon
<i>HBG1</i>	gene gama alanina
<i>HBG2</i>	gene gama glicina
<i>HBZ</i>	gene zeta
<i>HBZP</i>	pseudogene zeta
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina adulta ou hemoglobina A
Hb A ₂	Hemoglobina A ₂
Hb AS	traço falciforme
Hb C	Hemoglobina C
Hb D	Hemoglobina D-Los Angeles
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb Sβ-tal	interação entre hemoglobina S e beta-talassemia
Hb SC	interação entre as hemoglobinas S e C
Hb SD	interação entre as hemoglobinas S e D-Los Angeles
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HIF	Fator Induzível por Hipóxia
HIF-1α	Fator Induzível por Hipóxia - subunidade 1 alfa (proteína)
HIF-1β	Fator Induzível por Hipóxia - subunidade 1 beta (proteína)

<i>HIF1A</i>	Fator Induzível por Hipóxia - subunidade 1 alfa (gene)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IL	Interleucina
IC	Intervalo de Confiança
IL-1 β	Interleucina-1 beta (proteína)
IL-6	Interleucina-6 (proteína)
IL-8	Interleucina-8 (proteína)
<i>IL1B</i>	Interleucina-1 beta (gene)
<i>IL8</i>	Interleucina-8 (gene)
ISSN	Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas
IVS-I-1	mutação na posição 1 do íntron 1 do gene beta
IVS-I-6	mutação na posição 6 do íntron 1 do gene beta
IVS-I-110	mutação na posição 110 do íntron 1 do gene beta
LDH	Lactato desidrogenase
LDH1	Lactato desidrogenase, isoforma 1
LDH2	Lactato desidrogenase, isoforma 2
NO	Óxido Nítrico
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-AE	PCR - alelo-específico
PCR-RFLP	PCR - Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição
pH	Potencial Hidrogeônico
PLA2	Fosfolipase A2
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
STA	Síndrome Torácica Aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa (proteína)
TNFR1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TNFR2	Receptor 2 Fator de Necrose Tumoral
<i>TNFA</i>	Fator de Necrose Tumoral - alfa (gene)
TGF- β	Fator Transformante do Crescimento - beta (proteína)
TGF- β 1	Fator Transformante do Crescimento - beta, isoforma 1 (proteína)
<i>TGFB</i>	Fator Transformante do Crescimento - beta (gene)
<i>TGFB1</i>	Fator Transformante do Crescimento – beta, isoforma 1 (gene)
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (proteína)
<i>VEGF</i>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (gene)
<i>VEGFA</i>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular – A
VEGFR1	Receptor 1 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	A HEMOGLOBINA NORMAL HUMANA.....	30
1.2	HEMOGLOBINA S (Hb S) E DOENÇA FALCIFORME	32
1.2.1	Genótipos.....	33
1.2.2	Manifestações clínicas.....	34
1.2.3	Fisiopatologia	35
1.2.4	Inflamação	37
1.2.5	Resolução da Inflamação.....	42
1.2.6	Hipóxia	47
1.2.7	Angiogênese	49
2	OBJETIVOS	55
2.1	OBJETIVO GERAL	55
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1	CASUÍSTICA.....	57
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
3.3	COLETA DE INFORMAÇÕES PARA CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS E INFERÊNCIA DE GRAVIDADE HEMOLÍTICA E FENOTÍPICA.....	59
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	60
3.4.1	Genotipagem das amostras	60
3.4.2	Separação dos grupos de estudo	64
3.4.3	Análise dos polimorfismos	68

3.4.4	Quantificação dos níveis plasmáticos das proteínas.....	70
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
4	RESULTADOS.....	72
4.1	PERFIL HEMOLÍTICO DOS GENÓTIPOS DA DF	72
4.2	RASTREAMENTO DOS POLIMORFISMOS.....	75
4.3	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α E VEGF	78
4.4	POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE.....	81
4.5	RELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE.....	86
4.6	POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE EM STA E RETINOPATIA PROLIFERATIVA.....	100
5	DISCUSSÃO	111
5.1	PERFIL HEMOLÍTICO DOS GENÓTIPOS DA DF	111
5.2	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α E VEGF	114
5.3	POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE.....	118
5.4	RELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE.....	120
5.5	POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE EM STA E RETINOPATIA PROLIFERATIVA.....	123
6	CONCLUSÕES	128
	REFERÊNCIAS	131

APÊNDICES	145
APÊNDICE A – Testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias	145
APÊNDICE B – Análises moleculares para confirmação dos genótipos da DF	146
APÊNDICE C – Rastreamento dos polimorfismos	158
APÊNDICE D – Artigo de revisão publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ISSN 1516-8484)	166
APÊNDICE E – Artigo científico publicado na <i>Cytokine</i> (ISSN: 1043-4666).....	174
APÊNDICE F – Artigo científico submetido à <i>Hematology</i> (ISSN: 1024-5332)	183
ANEXOS	197
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética – CEP Hemorio	197
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética – CEP UNESP/IBILCE	198

APRESENTAÇÃO

A tese aqui apresentada, para obtenção do título de Doutor em Genética, é fruto do trabalho de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, e no Laboratório de Imunomorfologia, com coorientação da Profa. Dra. Sonia Maria Oliani. O estudo também contou com a colaboração da Médica hematologista responsável, Clarisse Lopes de Castro Lobo, do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – Hemorio.

O interesse pela investigação das vias de inflamação, hipóxia e angiogênese na doença falciforme surgiu durante o mestrado, a partir de observações realizadas pelo grupo de pesquisa e levantamentos da literatura. Durante a execução desse projeto de doutorado, os resultados observados cada vez mais despertavam a atenção para as variações na expressão fenotípica entre os diferentes genótipos da doença falciforme e aumentavam o interesse na continuidade dos estudos.

Como em toda pesquisa científica, dificuldades inerentes aos esforços do grupo foram encontradas em diferentes etapas de execução, seja devido a trâmites burocráticos ou pela necessidade de readaptação de técnicas, contudo, as adversidades não só foram incapazes de barrar o estudo, como, também, foram contornadas de maneira satisfatória.

O período de desenvolvimento da pesquisa, que ocorreu de março de 2012 a fevereiro de 2016, foi marcado por intensa troca de conhecimentos com colegas de laboratório, pesquisadores da área e em reuniões científicas. As conclusões alcançadas até o momento conduziram a elaboração de artigos científicos publicados ou já submetidos a revistas indexadas, além daqueles em fase de redação.

Dentre os trabalhos já publicados, relacionados ao assunto tratado na tese, há um artigo intitulado “*Frequencies of -308G/A (TNFA) and -509C/T (TGFB1) polymorphisms in sickle cell anemia patients from Brazil*”, publicado na *Genetics and Molecular Research*, em 2013. Posteriormente, um comentário científico sobre o estudo “*Influence of β^S -globin haplotypes and hydroxyurea on tumor necrosis factor-alpha levels in sickle cell anemia*” foi elaborado para a Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, e publicado em 2014. Em sequência, um artigo de revisão, intitulado “*Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis*”, foi publicado na mesma revista, em

2015. Ainda, o artigo apresentado no Exame Geral de Qualificação, “*Plasma levels of TGF- β 1 in homeostasis of the inflammation in Sickle Cell Disease*”, foi publicado na *Cytokine*, e o manuscrito “*Phenotypic diversity of the sickle cell disease in double heterozygous SD-Punjab*” foi submetido à *Hematology*.

Por fim, em fase de redação, existem mais dois artigos científicos. Um sobre o perfil hemolítico dos indivíduos portadores dos diferentes genótipos para a doença falciforme, e outro sobre os marcadores plasmáticos quantificados, mostrando a relação das vias de inflamação, hipóxia e angiogênese investigadas. Este último corresponde ao principal resultado obtido na tese, por ser o dado que melhor respondeu aos nossos objetivos.

A expectativa é de que muitos outros frutos ainda sejam gerados a partir do trabalho em questão, contribuindo para a pesquisa com doença falciforme em todo o mundo e, principalmente, em longo prazo, melhorando a vida da Pessoa com doença falciforme.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A HEMOGLOBINA NORMAL HUMANA

A molécula de hemoglobina, proteína mais abundante no interior dos eritrócitos, tem sua estrutura tetramérica formada por duas cadeias do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β). Cada subunidade é composta por duas frações: a proteica, representada pela globina, e a prostética, que corresponde ao grupo heme (SCHECHTER, 2008).

As cadeias do tipo α são codificadas por uma família gênica localizada na região cromossômica 16p13.3, que inclui três pseudogenes: *HBZP* (pseudozeta), *HBA1P* (pseudoalfa 1) e *HBA2P* (pseudoalfa 2); e três genes funcionais: *HBZ* (zeta), *HBA1* (alfa 1) e *HBA2* (alfa 2). A família de genes codificante de cadeias do tipo β encontra-se na região 11p15.1 e é composta por um pseudogene, *HBBP* (pseudobeta), e cinco genes funcionais: *HBE* (épsilon), *HBG2* (gama glicina), *HBG1* (gama alanina), *HBD* (delta) e *HBB* (beta) (Figura 1). Mudanças na expressão desses genes durante os períodos de vida embrionária, fetal e adulta permitem que diferentes tipos de hemoglobinas sejam produzidos em cada etapa do desenvolvimento (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

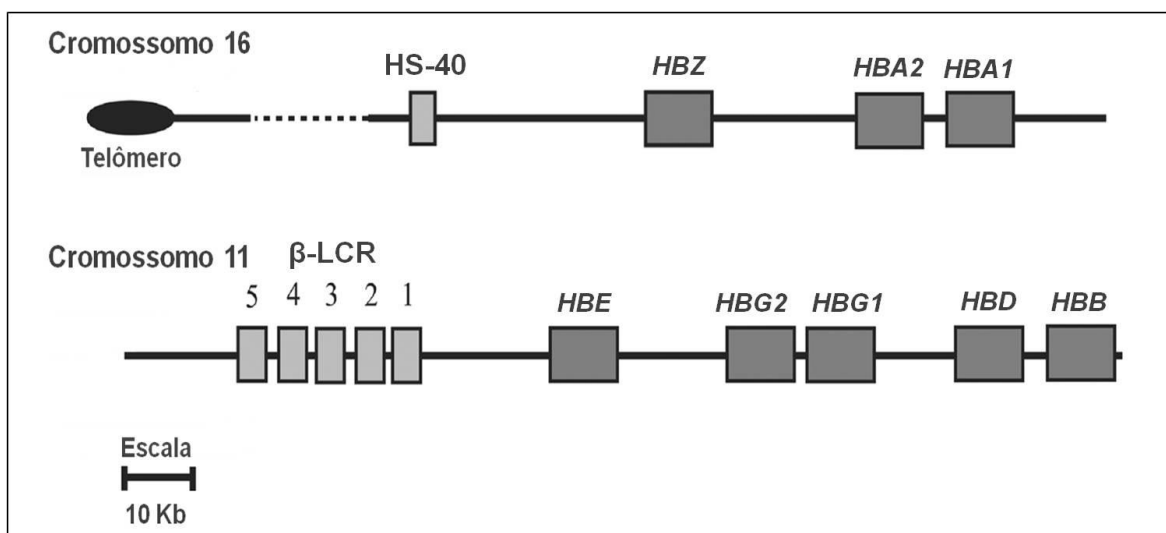


Figura 1. Representação esquemática dos principais membros das famílias gênicas das globinas. Os genes da família alfa (α) estão situados no cromossomo 16 e encontram-se sob o controle da região reguladora HS-40. No cromossomo 11 estão os genes da família beta (β), controlados por um grupo de elementos reguladores na chamada região controladora de locus (LCR) (modificado de HIGGS et al., 2005).

Durante o período embrionário, as hemoglobinas Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Portland II ($\zeta_2\beta_2$) são predominantes. Na vida fetal, predomina a

hemoglobina fetal (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$), ao passo que, no período pós-natal, essa hemoglobina é gradualmente substituída pela hemoglobina adulta (Hb A) ($\alpha_2\beta_2$), que se torna majoritária, e pela hemoglobina A₂ (Hb A₂) ($\alpha_2\delta_2$), minoritária (WEATHERALL, CLEGG, 2001; SCHECHTER, 2008). Estabilizadas as taxas de produção das globinas, um indivíduo com perfil normal de hemoglobinas apresenta, aproximadamente, 97% de Hb A; de 2,5% a 3,5% de Hb A₂ e até 1,0% de Hb F (SCHECHTER, 2008) (Figura 2).

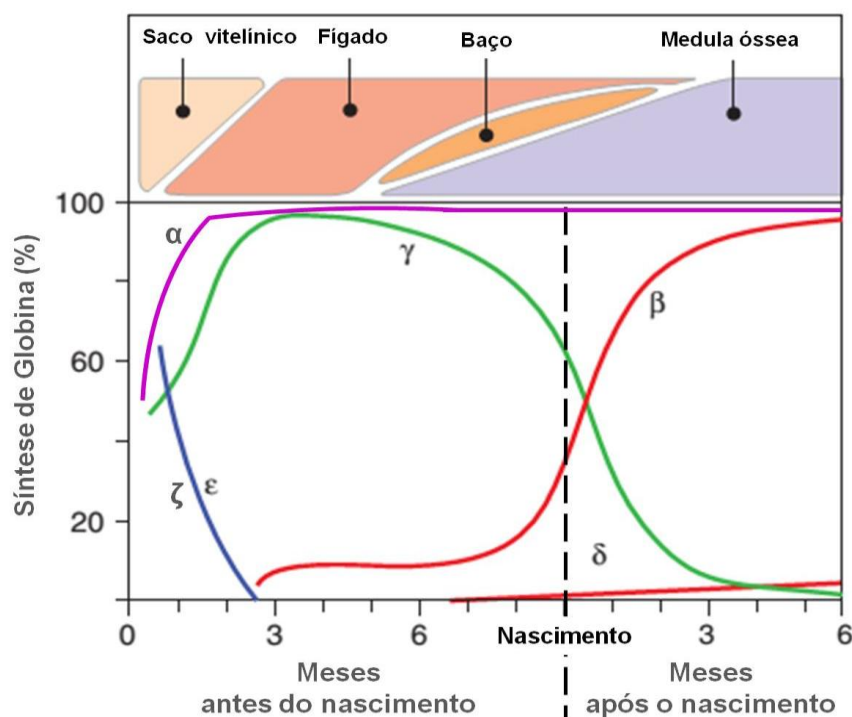


Figura 2. Ontogenia das cadeias de globina: representação esquemática da expressão das principais cadeias ao longo do desenvolvimento. Observam-se a porcentagem de produção de cadeias e os principais sítios de eritropoiese em cada período (modificado de SANKARAN; ORKIN, 2013).

Alterações genéticas que afetam a síntese das cadeias globínicas, em sua estrutura molecular ou quantidade, dão origem às hemoglobinopatias, que compreendem as talassemias e as variantes de hemoglobina. As talassemias são causadas pelo desequilíbrio quantitativo de cadeias, devido a defeitos na taxa de síntese das globinas, enquanto as variantes são decorrentes de alterações na estrutura proteica das cadeias, que interferem nas características físico-químicas da molécula (STEINBERG et al., 2001; BAIN, 2011).

No banco de dados *HbVar - Globin Gene Server*¹, até janeiro de 2016, haviam sido descritas 1248 variantes de hemoglobinas e 480 alterações genéticas relacionadas às talassemias.

1. *Hb Var* é um banco de dados de hemoglobinas variantes humanas e talassemias, inserido no domínio *Globin Gene Server*, que traz informação genética, laboratorial e clínica sobre cada um dos tipos de variantes e talassemias já descritas na literatura. Disponível em <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/> Acesso em 14 de janeiro de 2016.

1.2 HEMOGLOBINA S (Hb S) E DOENÇA FALCIFORME

Hb S é uma proteína com características estruturais e bioquímicas diferentes da hemoglobina normal, originada a partir de uma mutação de ponto no gene beta (*HBB*:c.20A>T; rs334), que leva à substituição do ácido glutâmico por valina no sexto códon da cadeia β . Moléculas de Hb S são normais quanto à capacidade de ligação ao oxigênio, porém, a mutação produz um motivo hidrofóbico na hemoglobina desoxigenada, que leva à ligação entre duas cadeias β de moléculas distintas. Essa ligação favorece a polimerização, que se estende e preenche o eritrócito, alterando sua arquitetura e flexibilidade (KATO et al., 2009; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A heterozigose para a Hb S (Hb AS ou traço falciforme) confere aos eritrócitos cerca de 30-40% de Hb S e não está associada a alterações clínicas perceptíveis em condições normais (STEINBERG, 2008; SERJEANT, 2013). Em contrapartida, a homozigose para a Hb S, referida como anemia falciforme, e a sua interação com talassemias ou outras hemoglobinas variantes, frequentemente estão associadas a manifestações clínicas, caracterizando a Doença Falciforme (DF) (STEINBERG, 2009; BAIN, 2011).

A DF predomina em regiões em que a malária é ou foi prevalente, devido à hipótese de proteção à malária conferida ao portador de traço falciforme. A distribuição contemporânea das populações com Hb S, porém, não segue à risca esse modelo, em decorrência dos sucessivos eventos migratórios ocorridos desde o seu surgimento. Devido a sua origem ter ocorrido em continente africano e, como reflexo da contribuição desses povos na formação étnica de várias populações, a Hb S apresenta-se amplamente distribuída no mundo (PIEL et al., 2013) (Figura 3).

Estima-se que nasçam, por ano, mais de 300 mil crianças com a homozigose para a Hb S em todo o mundo, sendo dois terços só na África (PIEL et al., 2013). No Brasil, a distribuição da Hb S é heterogênea, dependendo da região e da composição da população, sendo maior na região nordeste, cuja prevalência do traço (Hb AS) está entre 6% e 10% (CANÇADO; JESUS, 2007). Em populações de origem africana, a anemia falciforme responde por cerca de 70% dos casos de DF, seguida da Hb SC (25%-30% dos casos) e, em terceiro lugar, da interação da Hb S com a beta-talassemia (Hb S β -tal) (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

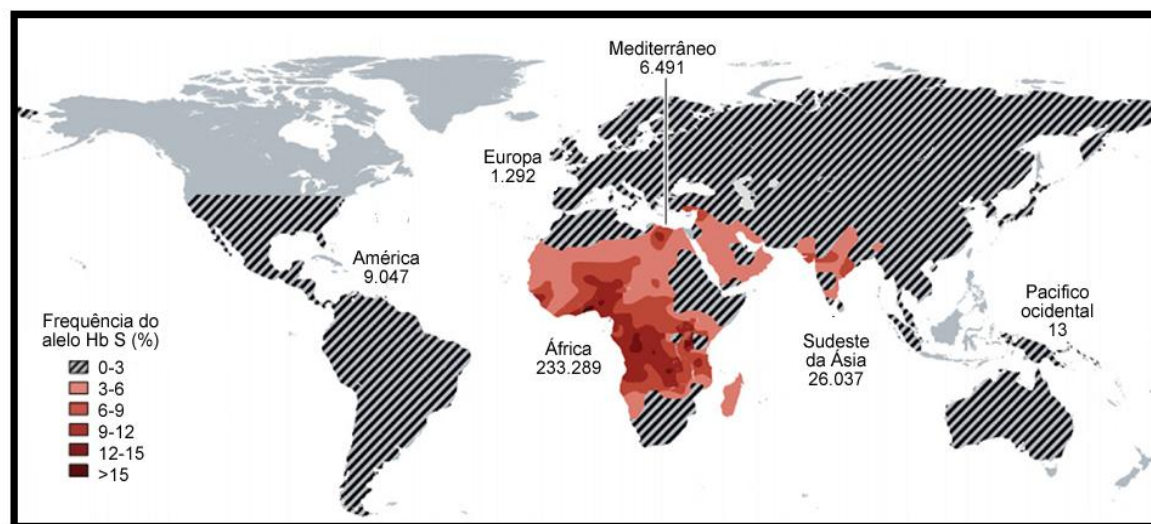


Figura 3. Distribuição geográfica do alelo *HBB*^S. Os dados são estimativos da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o número anual de indivíduos afetados com Hb SS, Hb SC e Hb S β -tal por região (modificado de REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

1.2.1 Genótipos

A expressão fenotípica na herança da DF é variável e dependente de fatores que afetam a concentração de Hb S dentro dos eritrócitos e/ou facilitam a sua polimerização. A diversidade clínica entre os genótipos é comumente observada, sendo as condições mais graves encontradas na homozigose Hb SS (STEINBERG, 2008; SERJEANT, 2013).

Na associação Hb S β -tal, o espectro de variação fenotípica é amplo, dependendo da mutação de β -tal envolvida e da quantidade de Hb A produzida (STEINBERG, 2008; SERJEANT, 2013). Quando a mutação inativa o gene *HBB*, têm-se a β^0 -tal, caracterizada pela ausência de produção de cadeias β . Dessa forma, a condição S β^0 -tal está relacionada a manifestações clínicas graves semelhantes às observadas na anemia falciforme. Se a mutação envolvida leva à redução parcial na produção de cadeias, a condição é a β^+ -tal, e a associação S β^+ -tal resulta em clínica de leve à moderada, cuja intensidade depende do grau de redução na síntese de cadeias β (GALANELLO; ORIGA, 2010; THEIN, 2013).

Por outro lado, o genótipo Hb SC é comumente associado a fenótipos mais brandos, ainda que se relacione à maior ocorrência de retinopatia proliferativa (SERJEANT, 2013). A mutação que dá origem à Hb C (*HBB*:c.19G>A; rs33930165) resulta na produção de lisina, em substituição ao ácido glutâmico, no sexto códon da cadeia β , e as alterações físico-químicas associadas à herança da Hb C envolvem o aumento da desidratação do

eritrócito e a formação intracelular de cristais, favorecendo a polimerização da Hb S na co-herança Hb SC (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003; LIONNET et al., 2012).

A associação da Hb S com a variante Hb D-Los Angeles ou Hb D-Punjab (Hb D) é menos frequente e pouco estudada, porém, na literatura há relatos de clínica moderada (STEINBERG, 2008; PATEL et al., 2013; SERJEANT, 2013). A Hb D é uma variante decorrente de mutação pontual (*HBB*:c.364G>C; rs33946267) que resulta na substituição do ácido glutâmico por glutamina na posição 121 da cadeia β . Associada à Hb S, os duplos heterozigotos Hb SD apresentam quadro clínico perceptível devido ao favorecimento da polimerização da Hb S na presença da Hb D (ADEKILE; MULLAH-ALI; AKAR, 2010; KÖSELER et al., 2012).

1.2.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas na DF são diversas e podem ocorrer em todos os genótipos, embora com frequência e gravidade variáveis. Dentre elas, destacam-se: anemia hemolítica crônica, crises algicas, hipertensão pulmonar, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular encefálico (AVE), falência renal, priapismo, úlceras de membros inferiores, osteonecrose, retinopatias e doenças cardiovasculares (BALLAS et al., 2012; SERJEANT, 2013).

De todas as manifestações clínicas, a STA parece ser a mais preocupante, por representar a segunda maior causa de hospitalizações e a maior causa de morte na DF, acometendo, principalmente, homozigotos para a Hb S. A STA é definida como sendo a ocorrência de um novo infiltrado pulmonar em ao menos um dos segmentos do pulmão, associada a, no mínimo, um dos seguintes sintomas: dor na região torácica, febre, tosse, taquipnéia ou ruídos respiratórios. Geralmente ocorre por causas infecciosas, em crianças, ou por embolia gordurosa decorrente de necrose da medula óssea, em adultos (GLADWIN; VICHINSKY, 2008; PAUL et al., 2011; BALLAS et al., 2012).

Embora a anemia falciforme seja a forma mais grave da DF, algumas complicações são observadas, mais frequentemente, em outros genótipos. É o caso da retinopatia proliferativa, uma manifestação tardia da DF, desencadeada por episódios vaso-oclusivos na retina e cuja ocorrência tem se mostrado maior em pessoas com Hb SC, aproximadamente 33%. Acredita-se que isso seja devido à maior viscosidade sanguínea

desses pacientes, nos quais o hematócrito e o estado de ativação da coagulação são mais elevados (BALLAS et al., 2012; KASSIM; DEBAUN, 2013; COLELLA et al., 2015).

1.2.3 Fisiopatologia

O evento primário responsável pelas complicações clínicas na DF é a polimerização da Hb S, sob condições de hipóxia, desidratação ou acidose, que resulta em alterações na conformação e flexibilidade dos eritrócitos e leva ao comprometimento das trocas iônicas, à desidratação e ao aumento da expressão de moléculas de adesão. Em decorrência da falcização dos eritrócitos, ocorrem a anemia hemolítica e os ciclos de isquemia-reperfusão mediados pela vaso-oclusão, podendo levar a disfunção endotelial, aumento da inflamação vascular, ativação da coagulação e estresse oxidativo (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013).

Os danos teciduais resultantes da oclusão vascular ocorrem em duas fases. A primeira se refere àqueles induzidos pela isquemia direta, cuja gravidade depende da extensão e duração da interrupção do suprimento sanguíneo. Quando há restauração do fluxo sanguíneo, com reperfusão da área anteriormente isquêmica, essa reoxigenação desencadeia a segunda e mais crítica fase, o estágio inflamatório. Nesse momento se estabelece a inflamação isquêmica e os danos aos tecidos e órgãos, devido à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), ativação endotelial, ativação de leucócitos e plaquetas, expressão de moléculas de adesão celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias no local (HEBBEL, 2014).

No processo desencadeado pela polimerização da Hb S e falcização dos eritrócitos, glóbulos vermelhos são destruídos precocemente, gerando um constante quadro hemolítico que cursa com grande quantidade de eritrócitos jovens, os reticulócitos, na circulação. Reticulócitos apresentam expressão aumentada de moléculas de adesão em sua superfície, em comparação aos eritrócitos maduros, facilitando interações com moléculas de adesão de leucócitos e células endoteliais. Durante a hemólise, também há liberação de hemoglobina e ferro heme no plasma, os quais representam uma fonte de estresse oxidativo e depleção de óxido nítrico (NO) (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2013; HOPPE, 2014).

A liberação de ferro heme na circulação resulta na geração de ERO, danos celulares e teciduais e consequente recrutamento de monócitos e macrófagos, estimulando uma resposta inflamatória sistêmica e contribuindo para o desenvolvimento de vasculopatias. A

liberação de hemoglobina livre no plasma durante a hemólise, por sua vez, diminui a biodisponibilidade de NO, o qual desempenha importante papel na vaso-dilatação, e também, medeia a inflamação na DF, por conter o estresse oxidativo, diminuir a expressão de moléculas de adesão e inibir a agregação plaquetária (HOPPE, 2014; RIFKIND; MOHANT; NAGABABU, 2015).

O NO apresenta meia vida curta no sangue, devido a sua rápida reação com a hemoglobina para formar meta-hemoglobina e nitrato. O excesso de hemoglobina livre no plasma, durante a hemólise, leva à depleção de NO, resultando em disfunção endotelial. Pacientes com DF apresentam um estado crônico de deficiência de NO, o qual é exacerbado durante os episódios vaso-oclusivos, devido ao seu consumo pela hemoglobina livre e por ERO, como superóxido e xantina oxidase, gerados durante ciclos de isquemia e reperfusão (Figura 4) (HOPPE, 2014; RIFKIND; MOHANT; NAGABABU, 2015).

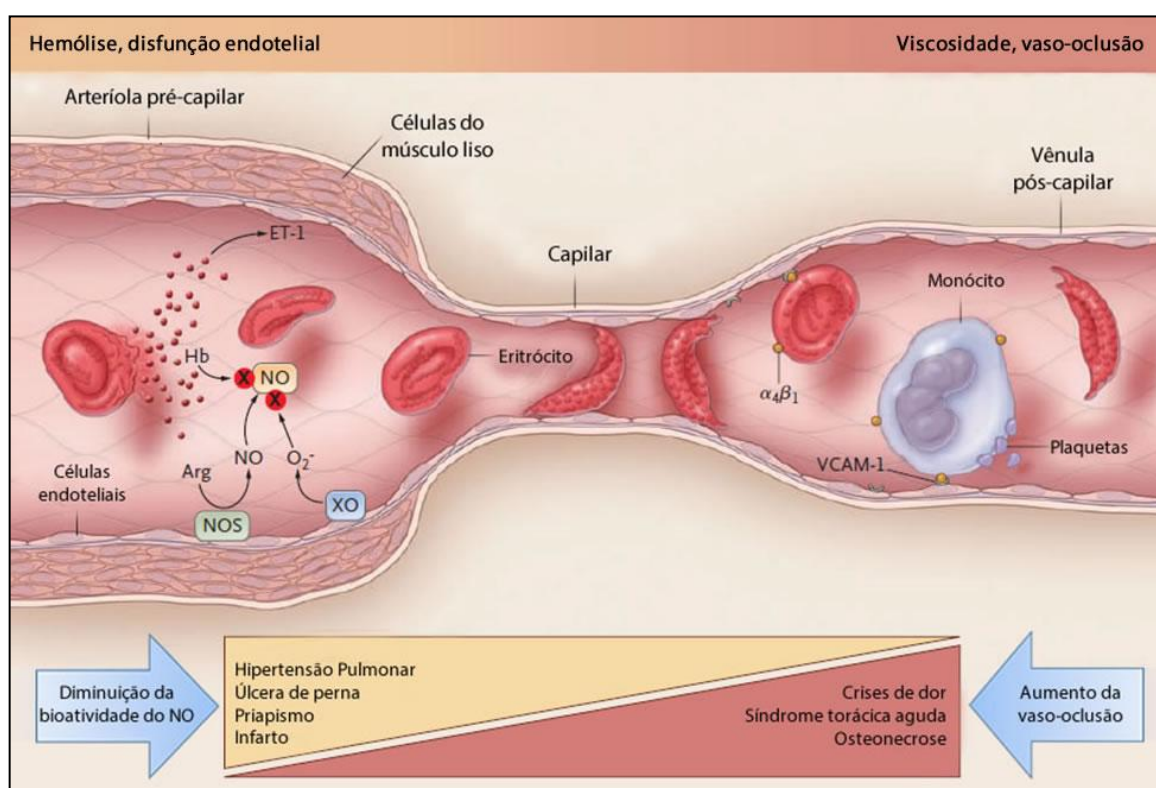


Figura 4. Mecanismos hipotéticos dos subfenótipos clínicos da DF. A hemólise intravascular está associada à disfunção endotelial mediada pela inativação do NO, devido à hemoglobina livre no plasma e às ERO. Como consequência, há o desenvolvimento de complicações como úlcera de membros inferiores, priapismo, hipertensão pulmonar, morte súbita e infarto (lado esquerdo da figura). A disfunção endotelial associada à hemólise pode causar inflamação, com recrutamento de leucócitos, além de expressão elevada de moléculas de adesão célula-célula ou células-endotélio, como VCAM-1. A contagem de glóbulos brancos elevada, resultando em obstrução de capilares por leucócitos e eritrócitos, está geralmente associada a complicações vaso-oclusivas como crise de dor, STA, necrose óssea avascular e retinopatias (lado direito da figura). ET-1 = endotelina; NOS = óxido nítrico sintase; O_2^- = superóxido; VCAM-1 = molécula de adesão vascular; XO = xantina oxidase (modificado de GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

1.2.4 Inflamação

Inflamação é a resposta fisiopatológica do organismo a infecções, exposição a toxinas, lesão celular ou danos teciduais. De modo geral, o processo inflamatório tem início quando células do sistema imune inato, residentes no tecido afetado, detectam o agente causador da infecção ou dano e sinalizam para os neutrófilos circulantes, os quais migram para o local. Por sua vez, os neutrófilos promovem o recrutamento de monócitos e macrófagos, bem como a potencialização do ambiente pró-inflamatório, de modo que o combate ocorra de forma eficiente. Em condições normais, após sua ação, os neutrófilos sofrem apoptose e são fagocitados por macrófagos (ASHLEY-KOCH et al., 2008; MANTOVANI et al, 2011; ORTEGA-GÓMEZ; PERRETI; SOEHNLEIN, 2013).

Embora desempenhe função protetora no controle a infecções e promoção de reparo tecidual, a resposta inflamatória exacerbada pode causar danos teciduais e doenças. A inflamação é componente fundamental da fisiopatologia da DF, podendo ocorrer de forma aguda e crônica, devido à polimerização da Hb S, que acarreta não somente a falcização do eritrócito e a hemólise intravascular, mas, também, uma cascata de interações celulares mediadas por proteínas inflamatórias denominadas citocinas (Figura 5) (HOPPE, 2014).

Citocinas são proteínas mediadoras da resposta imune, capazes de influenciar a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular, assim como regular a produção e atividade de outras citocinas, podendo aumentar (atividade pró-inflamatória) ou diminuir (atividade anti-inflamatória) a resposta inflamatória (ASHLEY-KOCH et al., 2008; STRIZ et al., 2014). Citocinas pró-inflamatórias são produzidas predominantemente por macrófagos ativados, destacando-se as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O fator transformante de crescimento beta (TGF- β) e a IL-6, embora tenham comumente atividade pró-inflamatória, podem apresentar ação anti-inflamatória em algumas circunstâncias (STRIZ et al., 2014; OWUSU-ANSAH et al., 2015).

As citocinas podem participar de vários mecanismos que contribuem para a vaso-occlusão na DF, incluindo a ativação endotelial, a indução da adesão de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular, o desenvolvimento de hiperplasia vascular, a ativação de plaquetas, a produção de endotelina-1 e a disfunção na apoptose de células endoteliais (ASHLEY-KOCH et al., 2008; OWUSU-ANSAH et al., 2015).

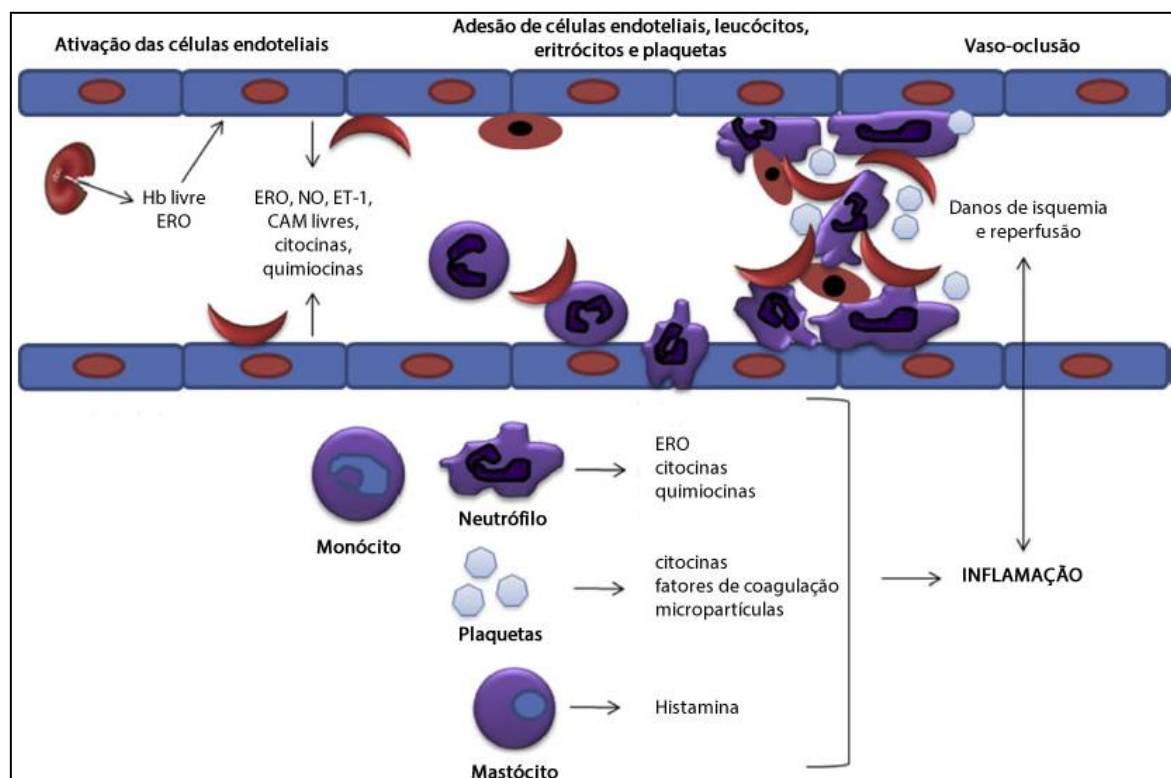


Figura 5. Papel da inflamação no processo vaso-oclusivo da DF. A hemólise leva à liberação de hemoglobina livre no plasma e produção de ERO, que interagem com o endotélio vascular, ativando-o. A falcização do eritrócito, a expressão aumentada de moléculas de adesão e a leucocitose, promovem a adesão entre as células e dessas com o endotélio, obstruindo os capilares sanguíneos. Os danos resultantes desse processo geram um ambiente inflamatório capaz de retroalimentar e agravar o processo. Hb = hemoglobina; ERO = espécies reativas de oxigênio; NO = óxido nítrico; CAM = moléculas de adesão celular (modificado de HOPPE, 2014).

A ocorrência da maioria das manifestações clínicas na DF se correlaciona com a quantidade de glóbulos brancos, indicando o papel dos leucócitos e da inflamação no desenvolvimento clínico da doença. A leucocitose é comum em pacientes com DF e é evidenciada pela elevação de, principalmente, monócitos e neutrófilos, e pelo aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL8 . Estudos já evidenciaram que o aumento de citocinas inflamatórias está relacionado à falcização e a gravidade vaso-oclusiva na DF (QARI; DIER; MOUSA, 2012; HOPPE, 2014).

Associações genéticas com mediadores da inflamação também suportam o envolvimento da via inflamatória na fisiopatologia da DF e podem, parcialmente, explicar a heterogeneidade fenotípica da doença (STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

1.2.4.1 Interleucinas (IL)

As ILs são moduladores essenciais da imunidade inata e estão envolvidas em praticamente todos os processos biológicos. A IL-1 β , pertencente à família IL-1, que compreende outros 10 membros, é uma das mais importantes citocinas moduladoras da resposta inflamatória aguda e crônica. A IL-1 β é produzida principalmente por monócitos e macrófagos, em resposta a estímulo inflamatório, como uma lipoproteína inativa, a qual é proteoliticamente processada a sua forma ativa pela caspase 1 (DINARELLO, 2009; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). Essa citocina é uma proteína envolvida na ativação de mecanismos sinalizadores celulares, induzindo a expressão gênica de outros fatores pró-inflamatórios, como IL-6 e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), os quais contribuem para a resposta inflamatória em diferentes tecidos. Ainda, está relacionada ao recrutamento e retenção de neutrófilos e, principalmente, de monócitos na circulação, ativação plaquetária, produção de NO e liberação de proteínas de fase aguda (Figura 6) (DINARELLO, 2009).

O gene *IL1B* está localizado na região cromossômica 2q14, sendo composto por sete exons e seis introns. Polimorfismos genéticos na região podem explicar variações individuais nos níveis da citocina. Cerca de 20 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) já foram descritos no gene, dos quais o mais importante funcionalmente é o -511C/T (rs16944), relacionado com alterações na transcrição gênica e consequente expressão da proteína. A presença do alelo mutante T é capaz de aumentar a transcrição do gene *IL1B*, elevando os níveis da citocina na circulação e promovendo aumento da resposta inflamatória (CHEN et al., 2006; VICARI et al., 2015). Na DF, há evidências do envolvimento do polimorfismo -511C/T em eventos vaso-oclusivos, por meio da sua ação em processos como inflamação, adesão celular e coagulação (ELLIOT et al., 2007; VICARI et al., 2015).

Outra interleucina que apresenta importante papel na resposta inflamatória é a IL-8. A IL-8 ou CXCL8, como também é conhecida, representa um dos 15 membros da família gênica de quimiocinas *CXC* e está localizada na região 4p13-q21, com quatro éxons e três introns. A IL-8 pode ser produzida e liberada por diferentes tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos e células endoteliais. Está envolvida na iniciação e amplificação da resposta inflamatória aguda e crônica, sendo que, sua principal função, durante o processo inflamatório, reside na quimiotaxia de células de defesa, especialmente de neutrófilos. A

adesão e migração de neutrófilos ao endotélio são reguladas pela IL-8, bem como a atividade pró-inflamatória dos neutrófilos, que também é estimulada pela ação da IL-8 (BAGGILIONI; CLARK-LEWIS, 1992; BAGGILIONI, 1998; JUNDI; GREENE, 2015). Dentre os SNPs descritos no gene *IL8*, destaca-se o polimorfismo -251A/T (rs4073), no qual a mutação leva ao aumento nos níveis circulantes da citocina e, consequentemente, aumento da resposta inflamatória (HULL; THOMSON; KWIATKOWSKI, 2000; CAJADO et al., 2010).

Níveis elevados de IL-8 têm sido identificados no plasma de pacientes com anemia falciforme, contribuindo para o agravamento da fisiopatologia da doença. Devido a sua propriedade quimioatrativa de neutrófilos, a IL-8 poderia estimular a adesão dessas células ao endotélio e favorecer a ocorrência de eventos vaso-oclusivos (LANARO et al., 2009; CAJADO et al., 2011; SAKAMOTO, 2013).

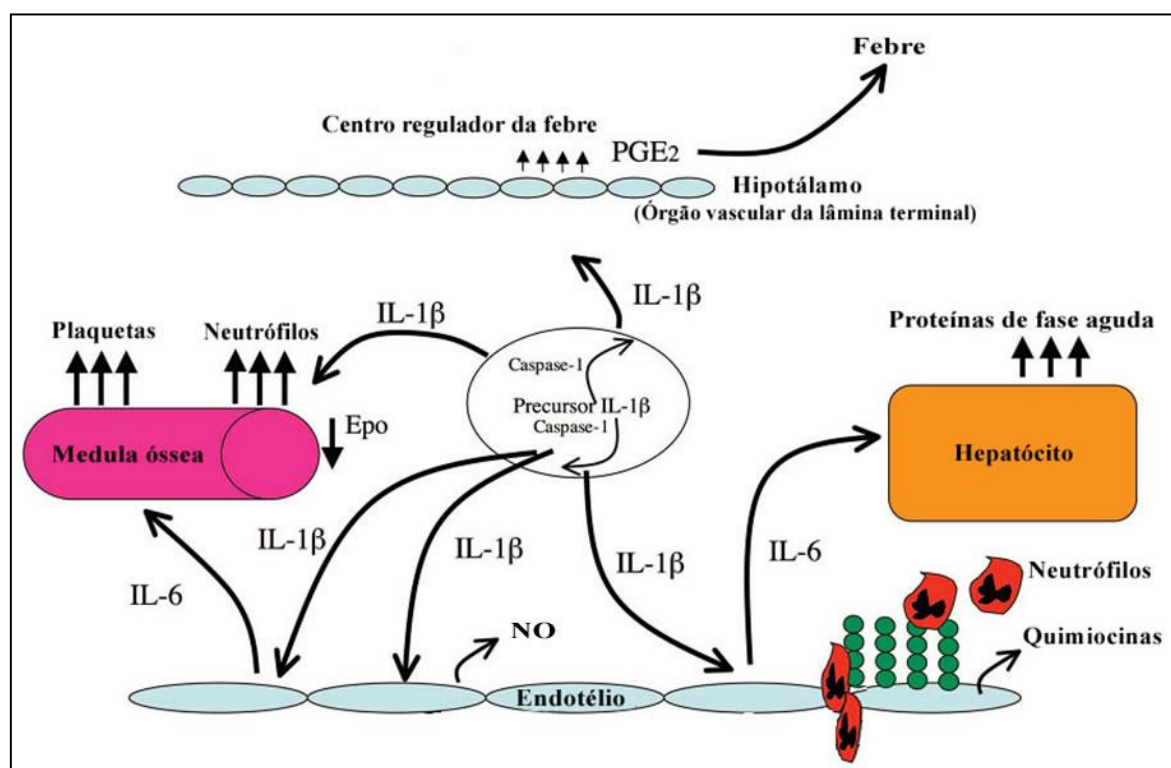


Figura 6. Ações da IL-1 β na inflamação. IL-1 β ativa é secretada por monócitos e macrófagos, após processamento pela caspase 1. A IL-1 β entra na circulação e age nos receptores alvos da rede hipotalâmica, resultando na síntese de ciclo-oxigenase-2, que eleva os níveis de prostaglandina (PG) E₂ e ativa o centro regulador da febre, aumentando a migração de leucócitos. A IL-1 β também ativa receptores no endotélio, levando à expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, que favorecem a transmigração de neutrófilos. A indução de óxido nítrico (NO) pela IL-1 β contribui para a diminuição da resistência vascular. A IL-6 liberada age nos hepatócitos, estimulando a liberação de proteína de fase aguda, e em células precursoras na medula óssea, resultando em maior produção de plaquetas e neutrófilos (modificado de DINARELLO, 2005).

1.2.4.2 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é um membro da superfamília TNF, composta por 19 ligantes e 29 receptores, os quais desempenham papéis altamente diversificados no organismo. Todos os membros da família possuem ação inflamatória, devido a ativação do fator de transcrição NF-kB. O TNF- α é secretado principalmente por macrófagos e corresponde à citocina pró-inflamatória mais importante da família, estando envolvido no crescimento, diferenciação e função celular, na ativação de leucócitos e células endoteliais, na indução da cascata de coagulação, na estimulação de macrófagos e na expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e em leucócitos. Corresponde à primeira citocina liberada na circulação após qualquer tipo de dano ou estresse, antecedendo até mesmo a IL-1 β (AGGARWALL; GUPTA; KIM, 2012; MONACO et al., 2015). Tais características fazem do TNF- α um importante fator de risco na doença falciforme, contribuindo para o agravamento da resposta inflamatória apresentada pelos pacientes (CAJADO et al., 2010).

A proteína TNF- α pode ser expressa tanto na forma transmembrana quanto na forma solúvel, e sua ação é dependente da interação com dois receptores específicos: TNFR1 e TNFR2. O ligante na sua forma solúvel ativa o receptor 1, enquanto a forma transmembrana se liga ao receptor 2 (GRELL et al., 1995; AGGARWAL, 2003). Aparentemente, as duas formas da proteína apresentam efeitos antagônicos, sendo a proteína transmembrana mediadora dos efeitos terapêuticos, e a proteína solúvel ligada aos efeitos patogênicos. No entanto, a forma transmembrana tem efeitos limitados em relação à forma solúvel e, por esse motivo, o TNF- α tem sido mais comumente associado a condições patológicas, como, por exemplo, na inflamação e disfunção endotelial (Figura 7) (ZHANG et al., 2009; AGGARWALL; GUPTA; KIM, 2012).

O cluster de genes da família *TNF* está localizado na região cromossômica 6p21.3 e apresenta cinco microssatélites (*TNFA-e*). Vários SNPs já foram descritos, entre eles o polimorfismo -308G/A do *TNFA* (rs1800629) (HAJEER; HUTCHINSON, 2001; AGGARWALL; GUPTA; KIM, 2012). Esse polimorfismo é um dos mais estudados, devido ao considerável efeito do alelo mutante A no aumento da transcrição do gene e, consequentemente, na exacerbação da resposta inflamatória. Há relatos de seu envolvimento na patogênese de várias doenças (HAJEER; HUTCHINSON, 2001; ELAHI et al., 2009; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2011), incluindo a anemia falciforme (ELAHI et al., 2009; CAJADO et al., 2010; CAJADO et al., 2011).

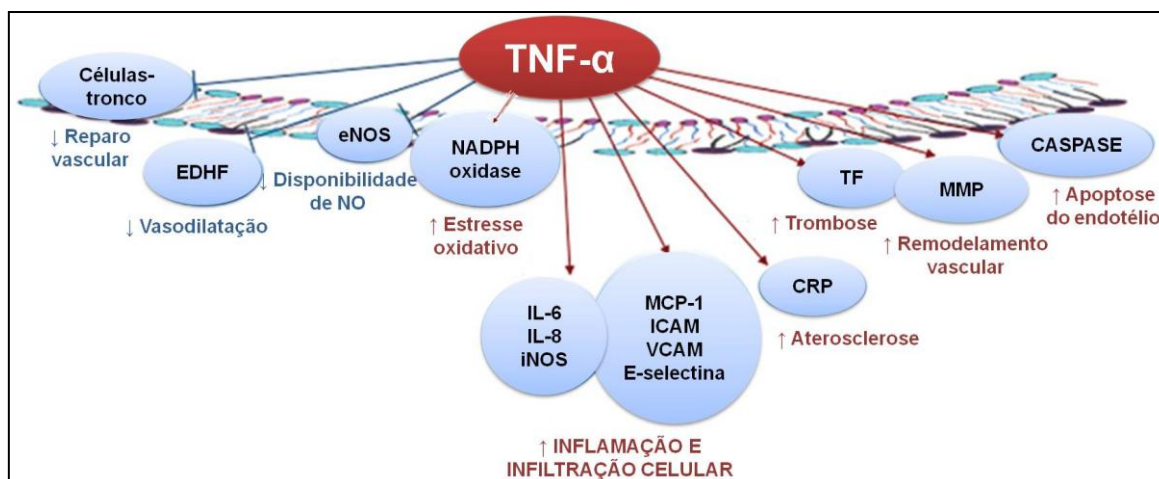


Figura 7. Papel do TNF- α na disfunção vascular. O TNF- α induz a expressão de várias citocinas e quimiocinas inflamatórias, iniciando e acelerando eventos como aterosclerose, trombose, inflamação vascular, apoptose de células endoteliais, remodelamento vascular e estresse oxidativo. Além disso, também diminui a disponibilidade de NO, a vasodilatação e o reparo tecidual. EDHF = fator hiperpolarizante dependente do endotélio; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; iNOS = óxido nítrico sintase induzível; MCP-1 = proteína quimioatrativa de monócitos; ICAM = molécula de adesão intracelular-1; VCAM = molécula de adesão vascular; CRP = proteína C reativa; TF = fator tecidual; MMP = metaloproteinase de matriz (modificado de ZHANG et al., 2009).

1.2.5 Resolução da Inflamação

Para prevenir a progressão da resposta inflamatória aguda e a persistência da inflamação crônica, evitando, assim, danos teciduais maiores, é necessário haver o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e efetores anti-inflamatórios. Os processos fundamentais para resolução da inflamação e retorno à homeostase incluem a limitação ou bloqueio da infiltração tecidual de neutrófilos, a regulação da produção e liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, a indução da apoptose de neutrófilos, com subsequente fagocitose por macrófagos (eferocitose), a alteração do estado de ativação de macrófagos e o retorno de células não apoptóticas aos vasos-linfáticos (Figura 8) (HEADLAND; NORLING, 2015).

Mediadores anti-inflamatórios podem agir nas diferentes etapas do processo de resolução da inflamação. Nesse contexto, destaca-se a anexina A1 (ANXA1), uma proteína com potente ação anti-inflamatória e promotora da homeostase do organismo, capaz de atuar reduzindo interações neutrófilo-endotélio e estimulando a eferocitose por macrófagos (HEADLAND; NORLING, 2015).

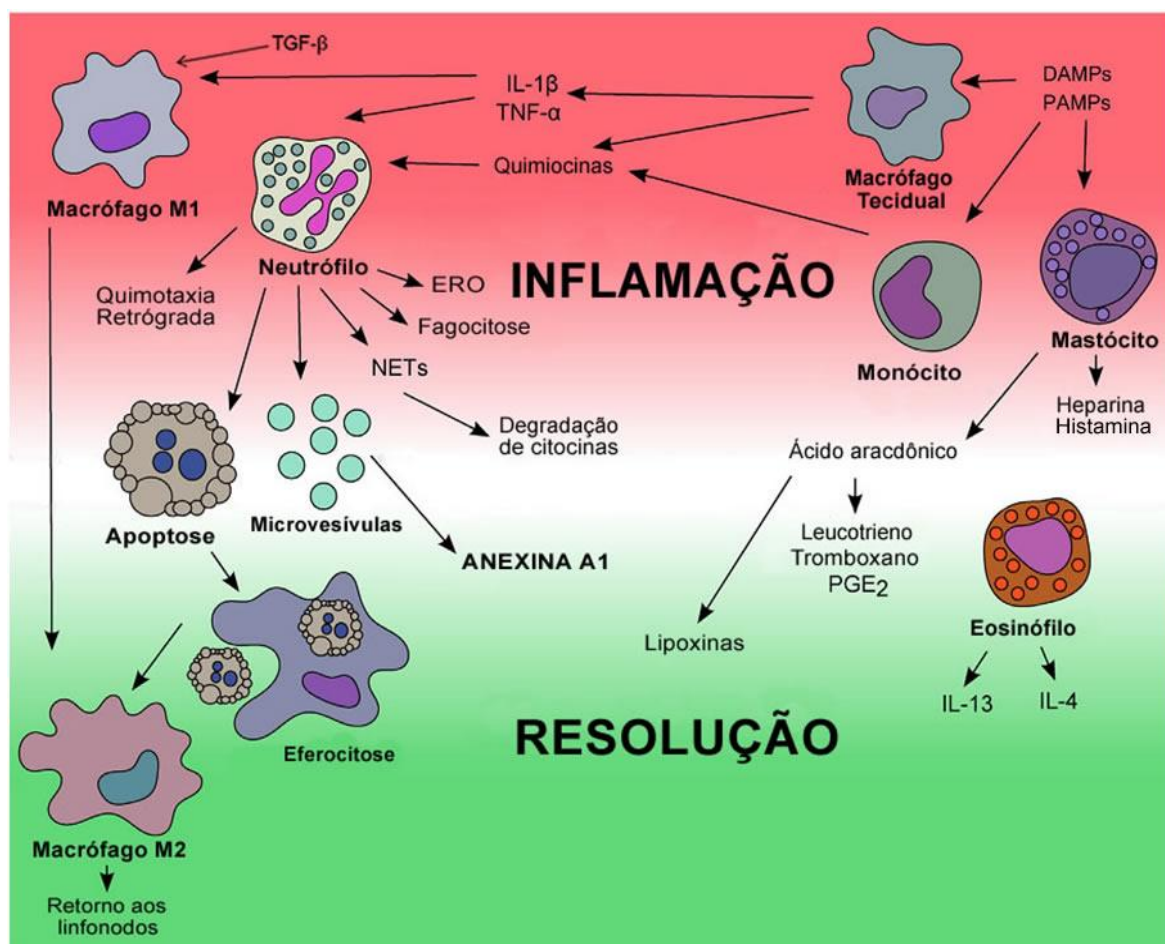


Figura 8. Representação esquemática da ação dos mediadores e componentes celulares relacionados com a inflamação e a resolução da inflamação. A resposta inflamatória tem início, primeiramente, por macrófagos teciduais e mastócitos, que ativam a produção e liberação de citocinas, quimiocinas, heparina e histamina, amplificando a resposta. Tais mediadores aumentam a permeabilidade vascular e recrutam neutrófilos que, quando ativados, transmigram através do endotélio, sofrem degranulação, geram espécies reativas de oxigênio (ERO), formam redes (NETs) e fagocitam corpos estranhos. A geração de ácido aracdônico produz mediadores pró-inflamatórios com papel na vasodilatação, agregação plaquetária e quimiotaxia de leucócitos. Contrariamente, a resposta inflamatória exacerbada, por si só, desencadeia processos responsáveis pela sua resolução. A produção de lipoxinas diminui a propagação da inflamação. Os NETs, quando em excesso, degradam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, inibindo o recrutamento de novos neutrófilos. A anexina A1, presente nos grânulos dos neutrófilos, é liberada durante a inflamação e age diminuindo o recrutamento, a adesão celular e a transmigração de neutrófilos. Citocinas como o TGF- β agem em macrófagos, alterando seu estado de ativação de pró-inflamatório (M1) para anti-inflamatório (M2). Durante a fase de resolução, neutrófilos apoptóticos são fagocitados por macrófagos (eferocitose) e as células não apoptóticas retornam à circulação. DAMPs: padrões moleculares associados a danos. PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos (modificado de HEADLAND; NORLING, 2015).

1.2.5.1 Anexina A1 (ANXA1)

As anexinas compreendem uma família conservada de proteínas relacionadas estruturalmente, das quais a ANXA1 foi o primeiro membro a ser clonado. Inicialmente, a ANXA1 foi denominada lipocortina, devido a sua propriedade de mimetizar a ação anti-inflamatória dos glicocorticoides, afetando os componentes da cascata inflamatória

(FLOWER; BLACKWELL, 1979). É expressa principalmente nos neutrófilos, perfazendo 2% a 4% do total de proteínas em seu interior. A externalização da ANXA1 permite a sua interação com a superfície das células alvo e, conseqüentemente, o desencadeamento de seus mecanismos anti-inflamatórios, que residem no controle da ativação e migração de leucócitos e da adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais, contribuindo para a resolução da resposta inflamatória (PERRETI; FLOWER, 2004; D'ACUNTO et al., 2014; HEADLAND; NORLING, 2015).

Estudos mostraram que a exposição de ANXA1 na superfície dos leucócitos exerce uma ação inibitória da inflamação, por reduzir a transmigração desses através do endotélio; (OLIANI et al., 2001; PERRETTI; FLOWER, 2004). Um dos alvos sugeridos da ação anti-inflamatória da ANXA1 é a enzima fosfolipase A2 (PLA2), que participa da produção de importantes mediadores inflamatórios por mastócitos, macrófagos, células endoteliais e leucócitos, os quais interferem nas propriedades adesivas das células endoteliais. A inibição dessa enzima, exercida pela ANXA1, prejudica as interações entre leucócitos e endotélio, diminuindo a capacidade de transmigração durante a resposta inflamatória (NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005; OLIANI; GIL, 2006).

Esse efeito proporcionado pela ANXA1 também pode ser benéfico em situações de isquemia e reperfusão, como mostrado por Mylinh et al. (2001) e em uma recente revisão de Qin et al. (2014) (Figura 9). Ambos os estudos abordam o papel da ANXA1 na redução de danos teciduais no miocárdio em decorrência dos ciclos de isquemia e reperfusão. Mylinh et al. (2001) sugeriram que a maior causa de danos teciduais seria a transmigração de leucócitos durante esses ciclos e, tendo a ANXA1 o papel de inibir o extravasamento de leucócitos, ela desempenharia um papel protetor contra esses danos. Em 2011, Facio-Júnior et al. também conduziram uma investigação em que os efeitos da ANXA1 foram protetores para os danos teciduais renais resultantes de isquemia e reperfusão, em modelo animal. Ciclos de isquemia e reperfusão são frequentes na DF, assim, a expressão diferencial dessa proteína entre os genótipos da doença pode estar envolvida com o leque de manifestações fenotípicas apresentadas pelos pacientes.

O gene *ANXA1* está localizado na região cromossômica 9q21.13 e, até o momento, poucos trabalhos relataram polimorfismos em sua sequência. Na região promotora, foram descritos apenas dois SNPs: -7494C/T e -7040G/T (LINDGREN et al., 2001; DONG et al., 2004), porém, nenhum estudo verificando possíveis influências na expressão da proteína foi realizado. Até o momento, não existem informações sobre a ação e o efeito dessa

proteína na DF, embora, aparentemente, o controle que exerce sobre a atividade inflamatória do organismo possa ser benéfico nesses pacientes, considerando a sua potencialidade em diminuir os problemas causados pelo quadro inflamatório intravascular.

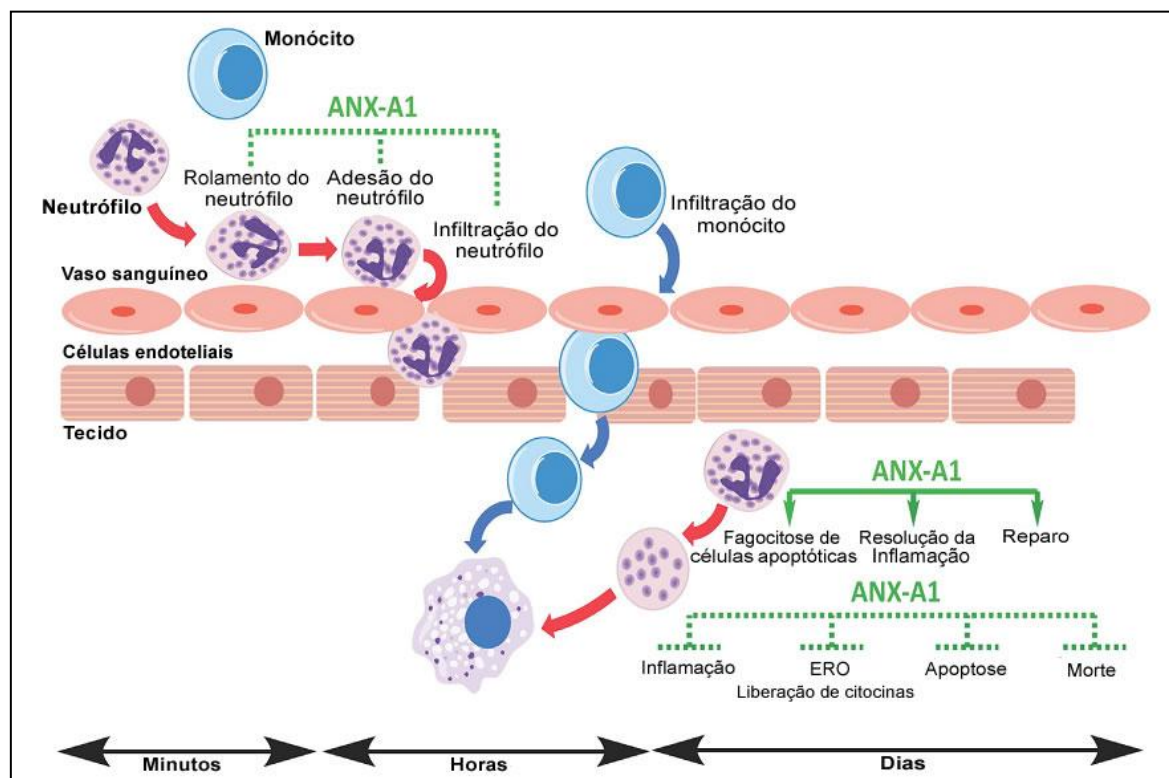


Figura 9. Ação da anexina durante mecanismos de isquemia-reperfusão. Após o processo isquêmico, a restauração do fluxo sanguíneo desencadeia uma intensa reação inflamatória, com liberação de citocinas e outros mediadores, que ativam e recrutam neutrófilos e monócitos/macrófagos para os sítios de inflamação. Neutrófilos ativados liberam microvesículas contendo anexina A1 (ANX-A1), que age nos neutrófilos limitando a interação célula-endotélio necessária para as etapas de rolamento, adesão e infiltração durante a transmigração para o tecido. No tecido, estimula a fagocitose de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos e a resolução da inflamação, inibe a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas e diminui a apoptose e morte celular, reduzindo e reparando danos teciduais. Setas vermelhas indicam inibição, enquanto setas azuis indicam estímulo (adaptado de QIN et al., 2014).

1.2.5.2 Fator transformante de crescimento beta ($TGF-\beta$)

O fator transformante de crescimento beta ($TGF-\beta$) é uma citocina pleiotrópica que afeta a proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular, e pode agir tanto como um regulador positivo quanto negativo da transcrição gênica, dependendo dos genes alvos e do contexto celular (Figura 10).

O $TGF-\beta$ existe em três isoformas: $TGF-\beta 1$, 2 e 3, sendo o $TGF-\beta 1$ a forma mais abundante (TRIKHA; CARSON III, 2014). Desempenha importante papel na resolução da inflamação, uma vez que está associado com a inibição da proliferação de células imunes e

com a supressão da atividade de células precursoras do sistema imune. O TGF- β também age como um potente inibidor da diferenciação de células T e indutor da apoptose de células B, devido a sua participação na quimiotaxia e polarização de macrófagos e neutrófilos no local da inflamação. Por outro lado, o TGF- β está envolvido na liberação de citocinas pró-inflamatórias de neutrófilos e no estímulo da diferenciação da linhagem de células pró-inflamatórias Th17 (Figura 11) (AKHURST; HATA, 2012; HAN et al., 2012).

A produção de TGF- β pode ser controlada por SNPs em seu gene localizado na região cromossômica 19q13.1, tais como o -509C/T no *TGFB1* (rs1800469), em que o alelo mutante T está associado com altos níveis de TGF- β 1 circulante (GRAINGER et al., 1999). A elevação de TGF- β tem sido descrita na anemia falciforme (CROIZAT; NAGEL, 1999; KEIKHAEI; MOHSENI; NOROUZIRAD, 2013) e polimorfismos genéticos no *TGFB*, em seus receptores e em membros da sua via de sinalização foram relacionados aos subfenótipos da doença, incluindo complicações clínicas como infarto do miocárdio, osteonecrose, priapismo, úlcera de perna e hipertensão pulmonar (STEINBERG, 2009).

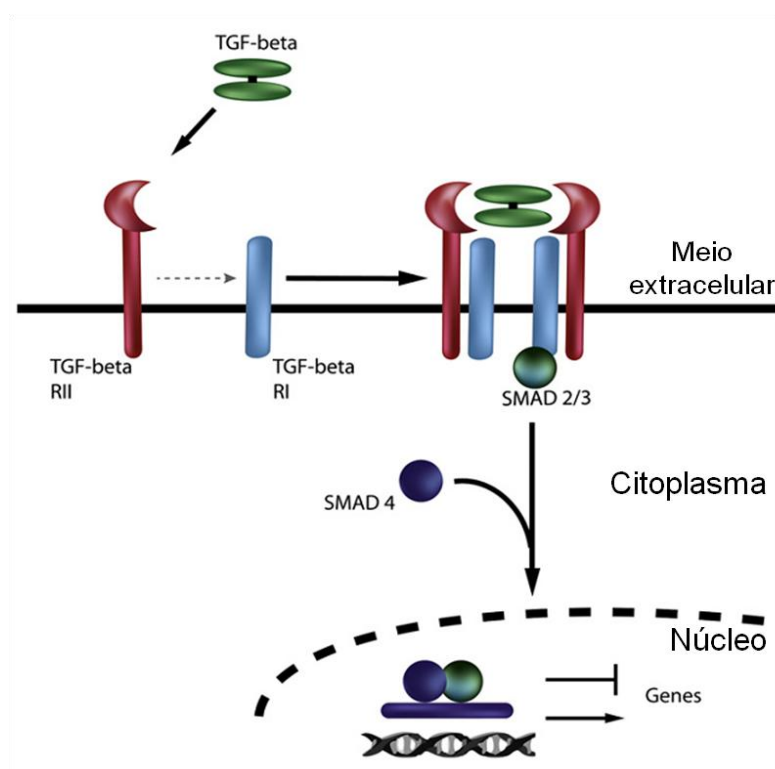


Figura 10. Principal via de sinalização do TGF- β . Dímeros de TGF- β ativados induzem à formação de um complexo entre os receptores do tipo II (TGF- β RII) e do tipo I (TGF- β RI) na superfície das células. A formação desse complexo inicia uma via de transdução de sinal, mediada por proteínas intracelulares transdutoras de sinal (SMAD) das classes 2 e 3 (classes reguladas por receptores). Essas, por sua vez, formam um segundo complexo com a SMAD classe 4 (classe de proteínas co-mediadoras), que se transloca para o núcleo e se liga a regiões específicas do DNA, ativando ou reprimindo a transcrição dos genes alvos (modificado de ARJAANS et al., 2012).

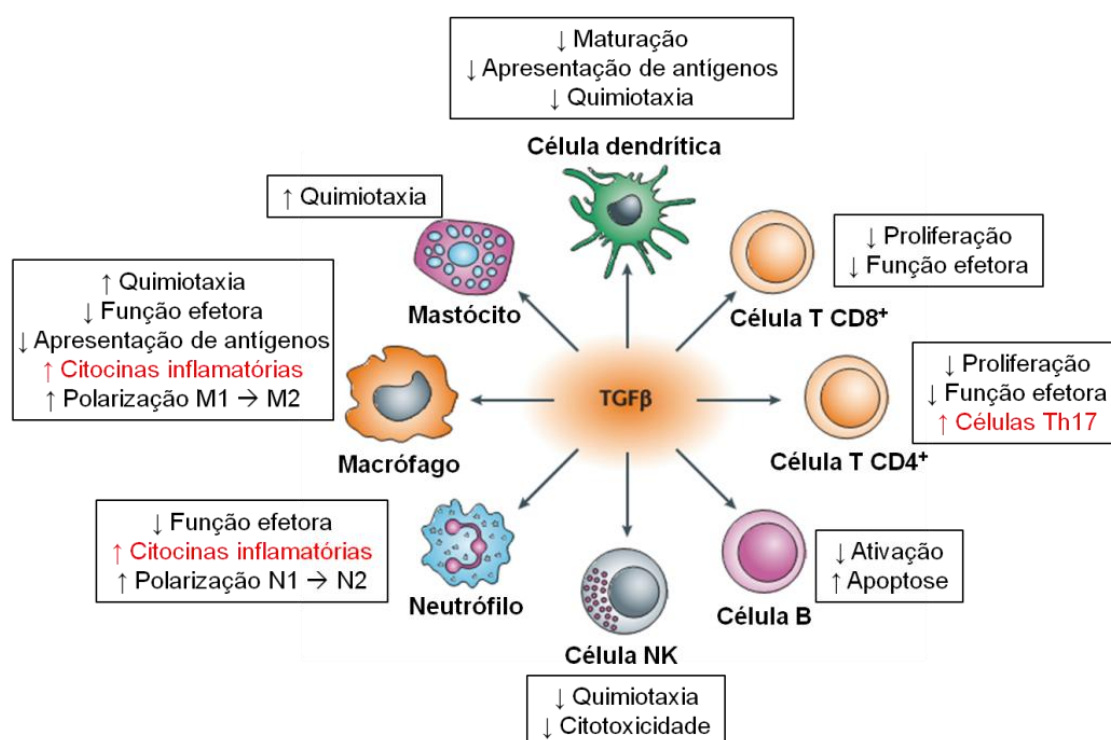


Figura 11. Principais efeitos do TGF- β nas células do sistema imune. A maioria das ações tem caráter anti-inflamatório. Em vermelho, estão destacadas as ações pró-inflamatórias (adaptado de AKHURST; HATA, 2012).

1.2.6 Hipóxia

Hipóxia é o termo utilizado para se referir à condição de baixa concentração de oxigênio em determinado local ou tecido do corpo, isto é, em áreas isquêmicas. Na DF, este processo é consequência do quadro inflamatório e da hipoxemia característica da doença, a qual gera uma situação de baixa pressão parcial do oxigênio no sangue arterial e diminuição da capacidade de transporte de oxigênio, devido à anemia crônica (CABOOT; ALLEN, 2014; IAMPIETRO; GIOVANNETTI; TARAZI, 2014).

Em baixas tensões de oxigênio, a Hb S sofre polimerização, levando à falcização dos eritrócitos e danos na membrana celular, que ocasionam hemólise e prejudicam a passagem do sangue pela microvasculatura, resultando em vaso-oclusão e isquemia de tecidos ou órgãos. Após a isquemia, o retorno da reperfusão é altamente estressante, pois com a restauração do fluxo sanguíneo e da oxigenação, há efeitos adversos como a indução do estresse oxidativo, adesão vascular, ativação da coagulação e ativação da cascata inflamatória (SUN; XIA, 2013; CABOOT; ALLEN, 2014; IAMPIETRO; GIOVANNETTI; TARAZI, 2014). Dessa forma, entende-se que a inflamação e a hipóxia

são eventos intimamente relacionados, podendo atuar de maneira conjunta na determinação fenotípica da DF. A hipóxia tecidual na DF é um processo complexo, persistente e intermitente, sendo reconhecida como um marcador e preditor de crises álgicas e vaso-oclusivas, STA e hipertensão pulmonar (CABOOT; ALLEN, 2014).

1.2.6.1 Fator alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α)

O HIF-1 é membro de uma família de fatores de transcrição que controlam uma variedade de processos fisiológicos e desempenham papel crítico na homeostase do oxigênio. Trata-se de uma proteína heterodimérica composta por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . As duas subunidades juntas ativam a transcrição de genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular, na inflamação e, principalmente, na angiogênese, incluindo o gene da eritropoietina (*EPO*) e o gene do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) (ZEPEDA et al., 2013; ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

A subunidade β é constitutiva, enquanto a subunidade α é sensível ao oxigênio. Em condições de normóxia, o HIF-1 α é rapidamente degradado por hidroxilação a resíduos de prolina, ao passo que, sob condições de hipóxia, a hidroxilação é inibida, promovendo o acúmulo e dimerização do HIF-1 α com a subunidade β e ativando a transcrição de seus genes alvos (Figura 12). Sendo assim, o HIF-1 α pode ser considerado um potencial marcador endógeno de hipóxia (ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

O *HIF1A* tem seu locus gênico em 14q21-24, e polimorfismos genéticos podem regular a expressão, estrutura e estabilidade do mRNA e/ou da proteína HIF-1 α (PRIOR et al., 2003). Os SNPs 1772C/T (rs11549465) e 1790G/A (rs11549467), no domínio de degradação do gene *HIF1A*, no éxon 12, estão relacionados ao aumento da atividade transcricional do gene tanto em hipóxia quanto em normóxia, além de aumento da angiogênese, devido à ativação da transcrição do *VEGF* (TANIMOTO et al., 2003; BAHADORI et al., 2010). Na DF, ainda não existem estudos acerca de polimorfismos nesse gene.

Considerando o papel desempenhado pelo HIF-1 α na homeostase do oxigênio e seu envolvimento com a resposta inflamatória, acreditamos que exista relação entre esse fator e a fisiopatologia da DF, uma vez que ela é caracterizada por condição de hipoxemia e inflamação crônica.

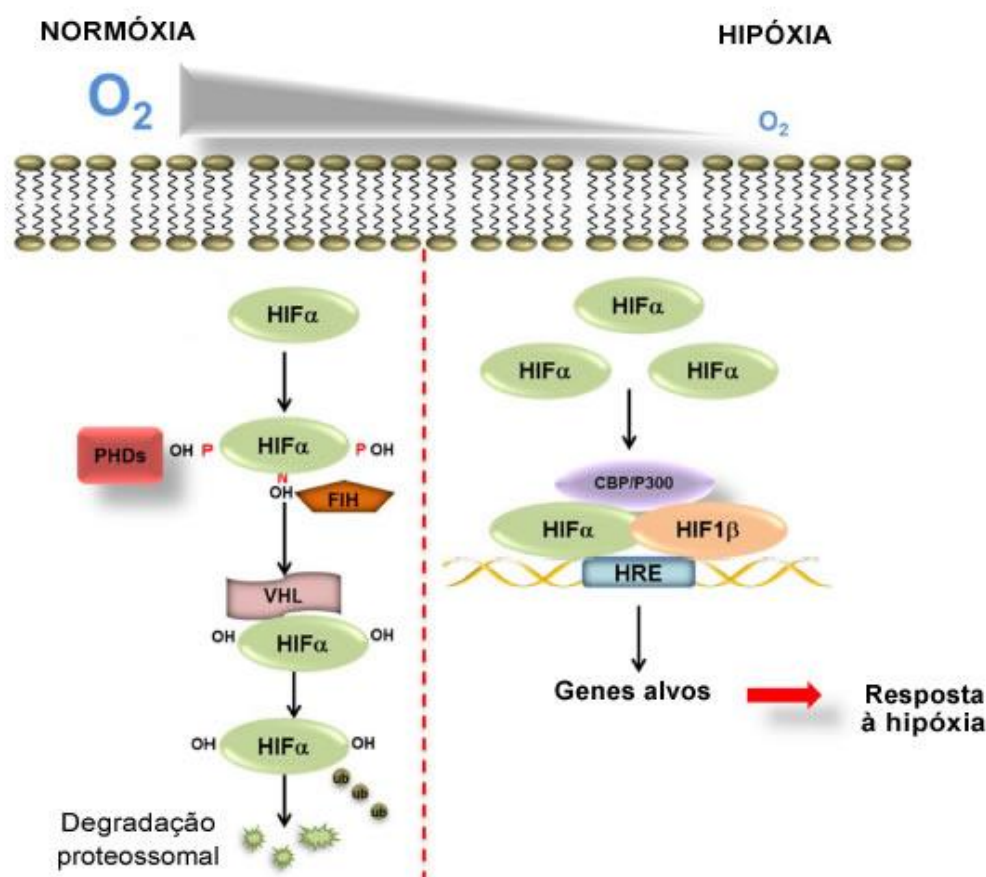


Figura 12. Regulação do HIF em normóxia e hipóxia. Durante a normóxia, enzimas proil hidroxilases (PHDs) e fatores de inibição de HIF (FIH) utilizam o oxigênio molecular como um cofator para a hidroxilação da subunidade HIF-1 α em resíduos de prolina e asparagina, respectivamente. A hidroxilação dos 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. Sua ligação a elementos responsivos à hipóxia (HRE) nos promotores e acentuadores dos genes alvos permite a regulação da transcrição gênica (modificado de ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

1.2.7 Angiogênese

Durante o desenvolvimento embrionário, os primeiros vasos sanguíneos se originam a partir de células progenitoras vasculares, em um processo denominado vasculogênese. Posteriormente, a expansão da vascularização, por todo o organismo, ocorre pela associação desse processo ao fenômeno de angiogênese, que corresponde ao mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos pré-existentes (MUÑOZ-CHÁPULI, 2011).

Em adultos, a maioria das células endoteliais está em estado quiescente e a atividade vascular é estável. Porém, a angiogênese no indivíduo adulto é um importante

mecanismo de reparação e remodelagem tecidual. A inflamação e a hipóxia tecidual são os principais desencadeadores da resposta angiogênica, por meio, principalmente, da ativação transcricional do *VEGF*. Quando células endoteliais quiescentes se tornam ativadas, ocorre alteração do seu equilíbrio proteolítico, culminando na degradação da membrana basal, com posterior proliferação e migração das células para outros locais. Ocorre, então, a secreção de uma nova lâmina basal, o recrutamento de células perivasculares e a reorganização tecidual para formação de um vaso novo e funcional (MUÑOZ-CHÁPULI, 2011).

1.2.7.1 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF é um dos principais reguladores da angiogênese e seus níveis são controlados por condições específicas, como hipóxia e inflamação (Figura 13). Atua, também, como agente quimiotático e como indutor da permeabilidade vascular. O VEGF integra uma família gênica composta por sete membros (*VEGFA-F* e fator de crescimento placentário), localizada na região cromossômica 6p12. Desses, o *VEGFA* é o que apresenta o maior papel promotor da proliferação e diferenciação de células envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos, tanto nos estágios iniciais do desenvolvimento, quanto na restauração do fluxo sanguíneo em áreas e tecidos isquêmicos. Ele é capaz de diminuir a senescência e restaurar a capacidade proliferativa das células endoteliais, aumentando a expectativa de vida e prevenindo a apoptose dessas células (BAO et al., 2009; TAIMEH et al., 2013; DEHGHANIAN; HOJATI; KAY, 2014).

O *VEGFA* é produzido, principalmente, por células endoteliais, fibroblastos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos, e as suas ações biológicas são mediadas pela ligação a dois receptores principais de alta afinidade, localizados na superfície endotelial dos vasos sanguíneos: o VEGFR1 e o VEGFR2. As principais funções angiogênicas, como controle da permeabilidade vascular, vasodilatação, proliferação, migração e sobrevivência celular e apoptose estão relacionadas à ligação ao VEGFR2. Contudo, o *VEGFA* também apresenta alta afinidade pelo receptor VEGFR1, que está associado à organização das células endoteliais nos vasos funcionais e à indução da migração de células progenitoras (BAO et al., 2009; TAIMEH et al., 2013; DEHGHANIAN; HOJATI; KAY, 2014).

Um estado pró-angiogênico pode estar associado à DF. Como visto anteriormente, a DF apresenta alterações celulares que levam a hemólise intravascular e vaso-oclusão

recorrente, associadas a inflamação vascular e ativação endotelial. Há relatos na literatura da produção alterada de VEGF em complicações clínicas da DF, devido ao aumento significativo dos níveis plasmáticos de VEGF durante crises vaso-oclusivas e processos inflamatórios. Alguns aspectos clínicos parecem estar envolvidos com a angiogênese, como retinopatia proliferativa, hipertensão pulmonar e úlcera de membros inferiores (HEBBEL; VERCELLOTTI; NATH, 2009).

Polimorfismos nos genes da família possivelmente estão relacionados às variações individuais na produção da proteína VEGF. Dentre os SNPs já descritos, destaca-se o polimorfismo -2578C/A (rs699947) no gene *VEGFA*, que está associado a baixas concentrações do fator, acarretando em menor capacidade para neoformação de vasos (FERRARA et al., 2003; SAMLI et al., 2012).

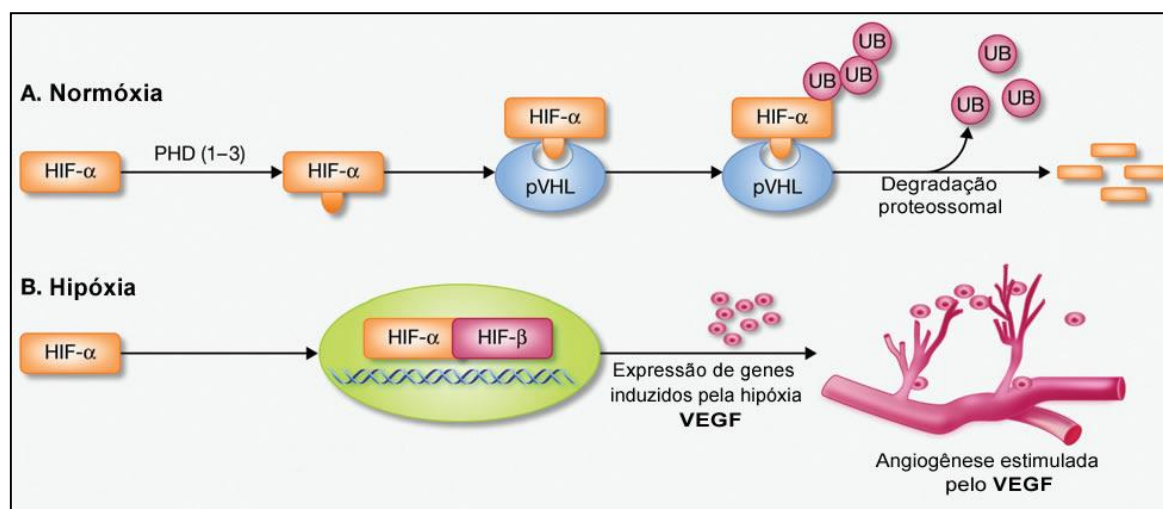


Figura 13. A expressão de VEGF é induzida pela hipóxia. Em condições de normóxia (A), a subunidade HIF-1 α sofre degradação proteossomal. Em hipóxia (B), porém, essa degradação proteossomal é inibida, e a subunidade HIF-1 α se dimeriza com a subunidade HIF-1 β , se translocando para o núcleo e promovendo a transcrição gênica do *VEGF*. Uma vez expresso, o VEGF estimula a angiogênese. PHD: enzimas prolin hidroxilases. pVHL: fator Von Hippel-Lindau. UB: ubiquitina (modificado de RAHIMI, 2012).

Com o exposto, observa-se que a inflamação, hipóxia e angiogênese são eventos intimamente relacionados com o desenvolvimento clínico da DF. Acredita-se que esses mecanismos possam se comportar de maneira diferente entre os portadores da doença, devido, tanto a características intrínsecas da DF, como os genótipos herdados para as hemoglobinas, quanto à herança de SNPs, capazes de conferir expressão diferencial de proteínas específicas (Figura 14).

Estudos de associação de genomas amplos (GWAS) mostram que aspectos genéticos individuais desempenham influência no perfil clínico de pacientes com DF e poderiam explicar, em parte, as manifestações fenotípicas tão diversificadas. Os polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*) podem influenciar na produção das respectivas proteínas, sendo possíveis candidatos de interferência no fenótipo dos portadores da DF. Polimorfismos no gene da *ANXA1* foram pouco estudados e ainda não há SNPs relacionados à produção de anexina.

Assim, o estudo da inflamação, hipóxia e angiogênese na DF, levando em consideração a variedade de genótipos da doença e a herança de polimorfismos, pode auxiliar no entendimento da sua grande diversidade fenotípica. Justifica-se, ainda, que a maioria dos trabalhos na literatura a respeito da DF é realizada em grupos de indivíduos homozigotos para a Hb S e pouco se conhece sobre os demais genótipos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento desses processos nos diferentes genótipos da DF em uma população multiétnica, como a brasileira.

A partir de levantamentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores, foi observada maior ocorrência de STA em pacientes com Hb SS e de retinopatia, principalmente em portadores de Hb SC (dados não publicados). Dessa forma, visando o maior entendimento da fisiopatologia da doença e prevalência dessas condições em genótipos específicos, também foi proposta a verificação dos níveis dos marcadores avaliados nessas situações clínicas e a influência de polimorfismos nessas condições.

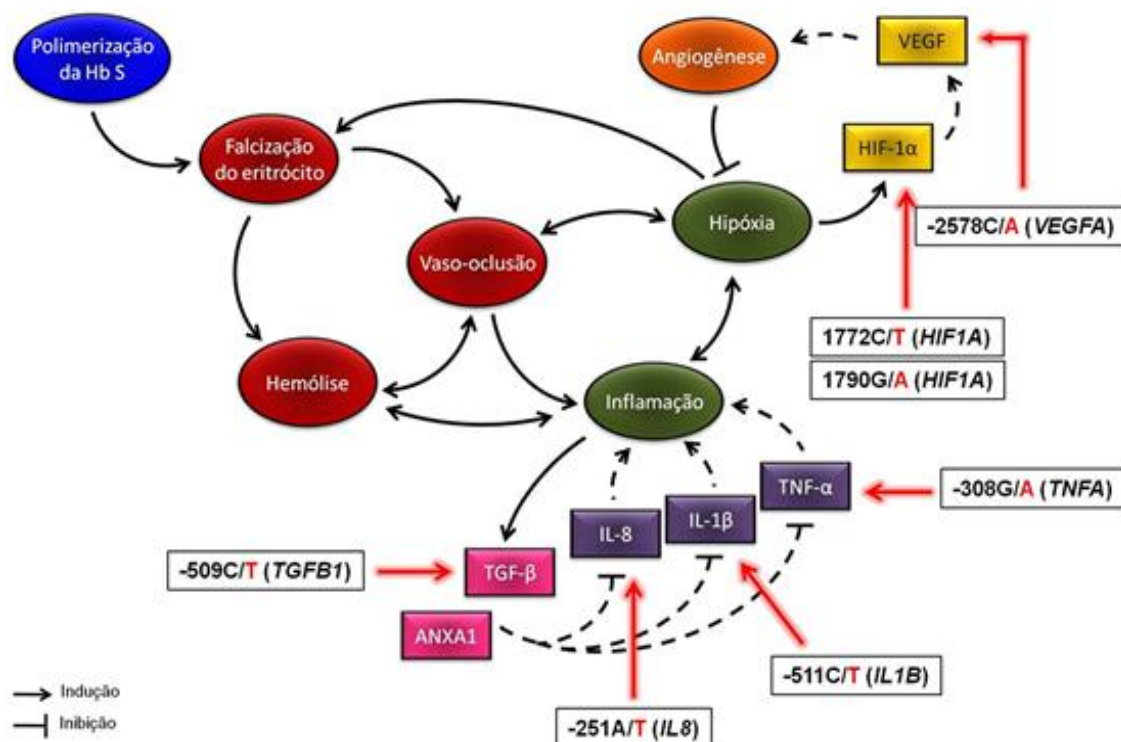


Figura 14. Hipótese para a relação existente entre as vias de inflamação, hipóxia e angiogênese na DF. Com a polimerização da hemoglobina S (Hb S) e a consequente falcização dos eritrócitos, ocorrem a hemólise e a vaso-oclusão, gerando uma condição de inflamação e hipóxia. A inflamação é estimulada por citocinas pro-inflamatórias, como IL-1β, IL-8 e TNF-α, e controlada por proteínas anti-inflamatórias, como o TGF-β1 e a ANXA1. A hipóxia, por sua vez, promove a ativação de HIF-1α, um fator de transcrição cuja principal ação é o estímulo transcricional de VEGF. A ação do VEGF favorece a angiogênese, e a reoxigenação promovida por essa neovascularização pode contribuir para o controle da hipóxia e da inflamação. Influenciando na expressão das proteínas relacionadas às vias de inflamação, hipóxia e angiogênese, têm-se os polimorfismos genéticos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*). Para a ANXA1, não há relatos de SNPs em seu gene influenciando nos níveis basais da proteína.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o comportamento de proteínas envolvidas nas vias de inflamação, hipóxia e angiogênese nos genótipos Hb SS, Hb S β -tal, Hb SC e Hb SD da doença falciforme (DF).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil hemolítico nos genótipos Hb SS, Hb SD, Hb S β -tal e Hb SC da DF;
2. Rastrear os polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*), em pacientes com DF e em grupo controle sem hemoglobinopatias;
3. Avaliar os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α e VEGF na DF e no grupo controle;
4. Avaliar a influência dos polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*) nos níveis plasmáticos das respectivas proteínas codificadas por esses genes, nos grupos controle e com DF.
5. Verificar a relação entre os níveis plasmáticos dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese, nos grupos controle e com DF.
6. Avaliar a frequência dos polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*) e os níveis plasmáticos dos marcadores IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α e VEGF, nos pacientes com DF, na presença e ausência de STA e retinopatia proliferativa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Amostras de sangue periférico de pessoas com DF foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 5%. Os pacientes, adultos, dos sexos masculino e feminino, foram provenientes do Hemocentro do Rio de Janeiro (Hemorio) – Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcante, local em que fazem acompanhamento. Indivíduos voluntários, adultos, de ambos os sexos e com perfil normal de hemoglobinas, provenientes do estado de São Paulo, fizeram parte do grupo controle. Os dados sobre manifestação fenotípica e medicação em uso de cada paciente foram obtidos por consulta aos prontuários e acesso ao banco de dados do hemocentro, sempre com autorização e acompanhamento dos clínicos responsáveis.

Para minimizar a influência dos tratamentos no fenótipo da DF e nos níveis plasmáticos dos marcadores a serem quantificados, critérios de exclusão foram adotados:

- *Idade*: o perfil hemoglobínico humano está completamente estabelecido a partir dos 10 anos de idade, por esse motivo, foram excluídos do estudo aqueles pacientes com idade inferior a 10 anos (GREER et al., 2014).
- *Regime transfusional*: Considerando que a realização de transfusões sanguíneas afeta os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos pacientes com DF, foi necessário compor os grupos de estudo com indivíduos que não tivessem recebido transfusão nos 60 dias anteriores à data de coleta das amostras. Como medida de controle, foi utilizada a concentração de Hb A, selecionando-se apenas indivíduos com concentrações inferiores a 10,0% (BALLAS, 2012). No grupo Hb S β -tal, isto não foi possível, pois grande parte dos pacientes com esse genótipo segue em regime transfusional. Além disso, em pacientes com Hb S β -tal, cuja mutação de β -talassemia confere o fenótipo β^+ , ainda há a produção de cadeias β^A normais e, consequentemente, de Hb A. Assim, foram mantidos nesse grupo de estudo indivíduos com diferentes valores de Hb A (>10% e <10%), os quais foram analisados separadamente quanto a possível influência nos parâmetros avaliados neste projeto. Naqueles parâmetros em que não houve diferença estatística em função da

concentração de Hb A, todos os indivíduos com Hb S β -tal foram unidos para comparação com os demais genótipos da DF.

- *Medicação:* A fim de minimizar a possível influência da medicação nos marcadores avaliados no presente trabalho, optou-se por evitar a inclusão de pacientes em uso de hidroxiureia, há pelo menos seis meses da data de coleta, e de anti-inflamatórios, há menos de três semanas (BALLAS, 2012).

Dessa forma, foi possível compor um grupo de estudo com 320 indivíduos, divididos em cinco subgrupos estabelecidos de acordo com os genótipos: Hb SS, Hb SC, Hb S β -tal, Hb SD e Hb AA (controle).

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP de São José do Rio Preto, local de realização da pesquisa, possui convênio de colaboração didático-científica com o Hemorio, formalizado pelo processo de número 000054/33/01/2012 (anexo A). O presente projeto também tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNESP, sob CAAE número 08813112.7.3001.5267 (antigo 08813112.7.0000.5466) (anexo B).

Os sujeitos da pesquisa estiveram expostos a um risco considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de hematoma no local da punção. Todas as informações fornecidas e os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram e serão mantidos em sigilo, por meio de codificações que impedem a identificação dos sujeitos da pesquisa. O conjunto de dados será utilizado para divulgação em reuniões e revistas científicas. A obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) se deu pela pesquisadora responsável ou por equipe de coleta do Hemorio, devidamente treinada para essa finalidade.

3.3 COLETA DE INFORMAÇÕES PARA CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS E INFERÊNCIA DE GRAVIDADE HEMOLÍTICA E FENOTÍPICA

Com a finalidade de caracterizar os grupos de estudo e auxiliar na interpretação dos resultados obtidos, optamos por realizar o levantamento de informações sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e clínicos dos indivíduos com DF, referentes à data de coleta da amostra de sangue, além de determinar a gravidade hemolítica dos diferentes genótipos.

Em relação aos índices hematológicos, foram levantadas, junto aos prontuários e banco de dados do Hemorio, as seguintes informações: quantidade de glóbulos vermelhos (M/ μ L), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), reticulócito absoluto (K/ μ L), reticulócito relativo (%), volume corpuscular médio (VCM; fL), hemoglobina corpuscular média (HCM; pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM; g/dL), quantificação de glóbulos brancos (K/ μ L) e plaquetas (K/ μ L). Tais informações são importantes parâmetros para caracterizar o grau de anemia e a consequente alteração na eritropoiese, assim como a existência de leucocitose, refletindo o constante processo inflamatório dos pacientes.

Para os dados bioquímicos, foram consideradas as dosagens de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), em U/L, e a concentração de bilirrubina total, direta (conjugada) e indireta (não-conjugada) (BT, BD e BI, respectivamente), em mm/dL, que são parâmetros de avaliação e monitoramento de hemólise e dano hepático.

Os parâmetros hematológicos foram avaliados quanto à diferenciação em citometria de fluxo e pela dosagem por espectrofotômetro (Cell-Dyn Ruby); os dados bioquímicos foram mensurados pelo método 2,4 – dichlorophenyl diazonio (Beckman coulter AV680). Ambos foram realizados por equipe do Hemorio.

Para avaliação fenotípica, conforme proposto, buscaram-se informações sobre a ocorrência de STA em algum momento da vida do indivíduo, até a data de coleta da amostra, e, também, da presença de retinopatia proliferativa, que foram as duas manifestações avaliadas quanto a possível correlação com os marcadores bioquímicos e genéticos propostos.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Cada amostra de sangue total coletada foi separada em duas alíquotas, uma destinada a genotipagem do perfil de hemoglobinas e análise dos polimorfismos, e outra que foi centrifugada para obtenção do plasma e armazenada a -20°C para posterior quantificação dos marcadores.

3.4.1 Genotipagem das amostras

As amostras passaram por testes laboratoriais clássicos, para análise do perfil de hemoglobinas, e moleculares, para identificação do genótipo. Os testes clássicos de diagnóstico, para direcionamento das análises moleculares, incluem as metodologias descritas a seguir, cujos protocolos detalhados encontram-se no APÊNDICE A.

3.4.1.1 *Análise da morfologia eritrocitária*

Análise de esfregaço sanguíneo no microscópio de luz, com objetiva de 40x, para avaliar o tamanho e forma dos eritrócitos, e quantidade de hemoglobina no interior das células.

3.4.1.2 *Avaliação da resistência dos eritrócitos à hemólise*

Teste realizado em solução de NaCl 0,36%. Eritrócitos normais sofrem hemólise em solução salina nessa concentração, enquanto eritrócitos microcíticos tendem a ser mais resistentes. Resultados positivos (resistência aumentada à hemólise) são encontrados, principalmente, em casos de beta-talassemia heterozigota ou em casos em que há presença de Hb C.

3.4.1.3 *Análise do padrão de migração das hemoglobinas em eletroforese em pH alcalino*

Hemolisados de sangue total com saponina são submetidos à eletroforese em Tampão TRIS/EDTA/Borato pH 8,6 em fitas de acetato de celulose. Com essa técnica é

possível identificar e quantificar as hemoglobinas normais e grande parte das anormais, com mobilidades eletroforéticas diferentes da Hb A.

3.4.1.4 Análise do padrão de migração das hemoglobinas em eletroforese em pH ácido

Eletroforese de hemoglobinas realizada em gel de ágar-fosfato, pH 6,2, que permite diferenciar alguns tipos de hemoglobinas que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino.

3.4.1.5 Quantificação das frações de hemoglobinas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

O equipamento VARIANT (BIO-RAD), com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota, foi utilizado para as quantificações. A técnica consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual as mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância *versus* tempo. O tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina é o chamado tempo de retenção. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos, com o perfil de hemoglobinas, o valor percentual e o tempo de retenção de cada fração.

De acordo com o perfil de hemoglobinas apresentado nos testes supracitados, as amostras foram direcionadas para as análises moleculares para confirmação e identificação dos genótipos. As metodologias moleculares utilizadas estão descritas a seguir e seus protocolos detalhados podem ser encontrados no APÊNDICE B.

3.4.1.6 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol, para aplicação de métodos de biologia molecular. Nesse procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e

aquosa, enquanto os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e podem ser separados facilmente por centrifugação. O DNA obtido desse processo de extração é adequado para aplicação em métodos de biologia molecular, como a amplificação por PCR.

3.4.1.7 PCR-RFLP para identificação de Hb S, Hb C e Hb D

A detecção das mutações foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da análise dos fragmentos de restrição, em técnica denominada PCR-RFLP. Os seguimentos iniciadores utilizados para as amplificações, bem como as enzimas de restrição e os fragmentos gerados encontram-se sumarizados no Quadro 1.

3.4.1.8 PCR-AE para identificação de beta-talassemia

Foi realizada a detecção direta dos alelos normais e mutantes por PCR alelo-específico (PCR-AE). Foram analisadas quatro mutações, que, segundo a literatura, correspondem às mais frequentes na população (GALANELLO; ORIGA, 2010). São elas:

- CD39 (HBB:c.118C>T; rs11549407);
- IVS-I-1 (HBB:c.92+G>T; rs33971440);
- IVS-I-6 (HBB:c.92+6T>C; rs35724775);
- IVS-I-110 (HBB:c.93-21G>A; rs35004220).

Nessa técnica foram utilizados um par de oligonucleotídeos iniciadores para controle interno da reação e outro par para a amplificação específica (na presença e na ausência da mutação). Os oligonucleotídeos utilizados e as sequências amplificadas encontram-se sumarizados no Quadro 2.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e padrão de restrição observados nas análises moleculares por PCR-RFLP para identificação das mutações de Hb S, Hb C e Hb D.

Mutação	Primers	Segmento amplificado	Enzima de restrição	Fragmentos gerados para cada alelo
Hb S (HBB:c.20A>T)	P 277: 5'-GGCAGAGCCATCTATTGCTTA-3' P 278: 5'-ACCTTAGGGTTGCCCATAAC-3'	382 pb	<i>DdeI</i> (5'-C↓TNAG-3')	A: 201 pb, 88 pb, 87 pb e 6 pb T: 288 pb, 88 pb e 6 pb
Hb C (HBB:c.19G>A)			<i>BseRI</i> (5'-GAGGAG(N) _{10/8} ↓-3')	G: 278 pb e 104 pb A: 382 pb
Hb D (HBB:c.364G>C)	CD1: 5'-TGCCTCTTTGCACCATCTTA-3' CD2: 5'-GA CTCCCACATTCCTTTT-3'	564 pb	<i>EcoRI</i> (5'-G↓AATTC-3')	G: 296 pb e 268 pb C: 564 pb

pb: pares de base. N: A, T, C ou G.

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores e fragmentos amplificados observados nas análises moleculares por PCR-AE para identificação das mutações de beta talassemia CD39, IVS-I-1, IVS-I-6 e IVS-I-110.

Mutação	Primers controle	Segmento amplificado	Primers específicos	Segmento amplificado
CD39 (HBB:c.1180C>T)	B5a: 5'-GGCTGTCATCACTTAGACCTCA-3' B5b: 5'-AGAAGGGGAAAGAAAACATCAA-3'	639 pb	PS39W: 5'-GACTCAAAGAACCTCTG-3' PS39M: 5'-GACTCAAAGAACCTCTA-3'	439 pb
IVS-I-1 (HBB:c.92+1G>T)			IVSI1W: 5'-GTGACCTTGATACCAAC-3' IVSI1M: 5'-GTGACCTTGATACCAAA-3'	268 pb
IVS-I-6 (HBB:c.92+6T>C)			IVSI6W: 5'-GTCTTGTAACCTTGATA-3' IVSI6M: 5'-GTCTTGTAACCTTGATG-3'	273 pb
IVS-I-110 (HBB:c.93-21G>A)			TB110W: 5'-GGGTGGGAAAATAGACC-3' TB110M: 5'-GGGTGGGAAAATAGACT-3'	337 pb

pb: pares de base. W (alelo selvagem); M (alelo mutante).

3.4.2 Separação dos grupos de estudo

De um universo de 1254 amostras de sangue de pessoas com DF, indivíduos com perfil compatível com Hb SS, Hb SC e Hb SD tiveram seus genótipos confirmados por Biologia Molecular. Amostras com perfil compatível com Hb S β -tal foram submetidas à análise das mutações mais frequentes na região sudeste (CD39, IVS-I-6, IVS-I-110 e IVS-I-1). Dessas, 70% tiveram seu diagnóstico concluído, enquanto 30% não apresentaram nenhuma das quatro mutações avaliadas. Duas amostras apresentaram a Hb S associada a variantes desconhecidas. A Figura 15 ilustra a distribuição das amostras quanto aos genótipos para a DF.

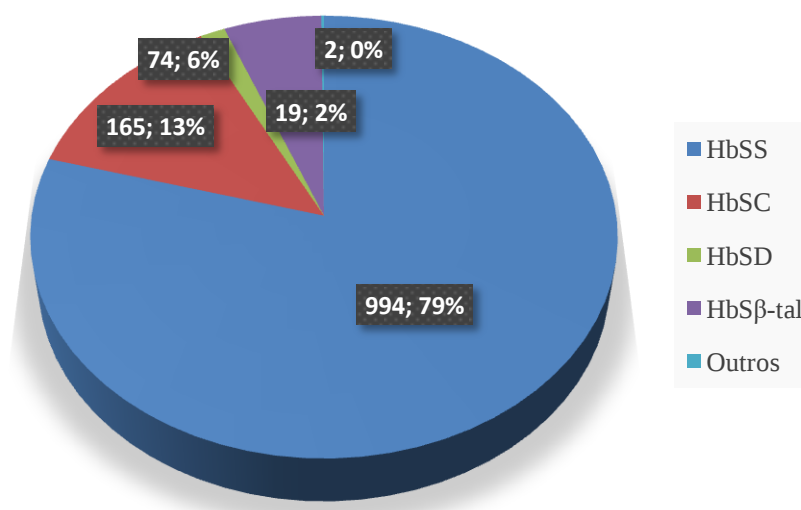


Figura 15. Distribuição genotípica (número de indivíduos; porcentagem) das amostras de pessoas com DF, do total de 1254 amostras avaliadas.

A partir desse universo amostral, as amostras foram selecionadas para comporem o grupo de estudo, de acordo com os genótipos e critérios de exclusão adotados, conforme citados no tópico 3.1 do presente trabalho.

Utilizando-se de tais critérios, foi possível compor um estudo com 81 indivíduos com perfil normal de hemoglobinas, fazendo parte do grupo controle, e 239 pacientes com DF, sendo 107 (44,8%) Hb SS, 83 (34,7%) Hb SC, 35 (14,6%) Hb S β -tal e 14 (5,9%) Hb SD. Das 35 amostras Hb S β -tal, cinco (14,3%) têm o genótipo heterozigoto para IVS-I-110, cinco (14,3%) o genótipo heterozigoto para CD39 e cinco (14,3%) são heterozigotas para IVS-I-6. As 20 (57,1%) amostras restantes não apresentaram nenhuma das mutações de beta-talassemia investigadas (Figura 16).

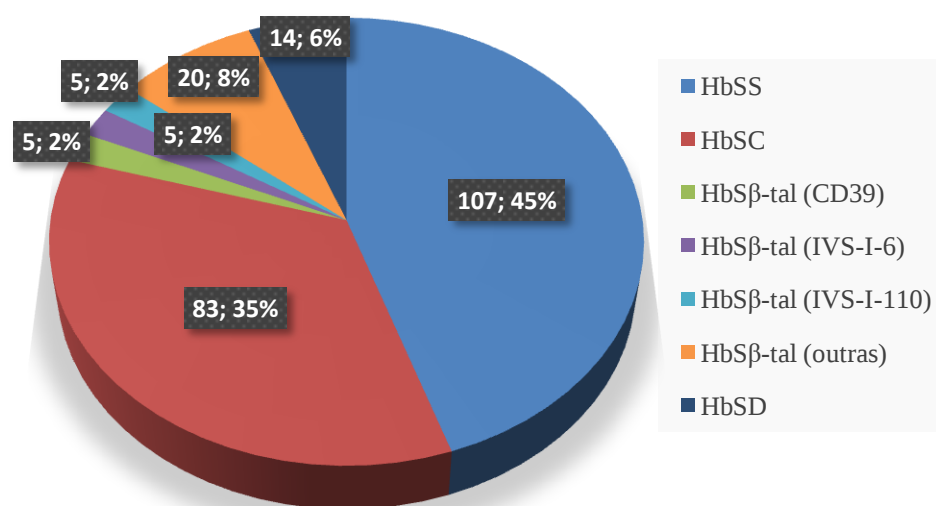


Figura 16. Distribuição genotípica (número de indivíduos; porcentagem) da DF nos indivíduos selecionados para o grupo de estudo.

Dados sobre o perfil hemoglobínico dos indivíduos, que foram obtidos durante os testes clássicos de triagem para confirmação do diagnóstico, bem como informações sobre idade e sexo, encontram-se dispostos na Tabela 1. O grupo Hb Sβ-tal foi separado de acordo com as concentrações de Hb A, que podem interferir nos parâmetros de hemólise, quando superiores a 10%. Os índices hematológicos e bioquímicos dos grupos de estudo com DF, obtidos a partir de consulta aos prontuários médicos, encontram-se dispostos na Tabela 2. O genótipo Hb Sβ-tal não diferiu significativamente em tais parâmetros, em função da concentração de Hb A, por esse motivo, são mostrado juntos na descrição dos dados.

Tabela 1. Caracterização das amostras incluídas nos grupos de estudo, bem como as concentrações médias das frações de hemoglobina presentes em cada genótipo.

Parâmetro	Grupos de estudo					
	Hb SS (n=107)	Hb SD (n=14)	Hb S β -tal (n=17)	Hb S β -tal* (n=18)	Hb SC (n=83)	Hb AA (n=81)
<i>Idade [anos; mediana (mínimo-máximo)]</i>						
	20 (10-64)	26 (10-43)	20 (10-54)	31 (10-59)	23 (10-75)	26 (18-62)
<i>Sexo [N (%)]</i>						
Feminino	68 (63,5)	6 (42,8)	10 (58,8)	10 (55,6)	40 (48,2)	25 (30,9)
Masculino	39 (36,5)	8 (57,2)	7 (41,2)	8 (44,4)	43 (51,8)	56 (69,1)
<i>Perfil de Hb (%; média $\pm$ desvio padrão)</i>						
Hb A (%)	-----	-----	-----	30,5 $\pm$ 16,7	-----	86,7 $\pm$ 1,1
Hb A ₂ (%)	3,8 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 1,7	5,3 $\pm$ 1,1	5,4 $\pm$ 7,1	3,0 $\pm$ 0,3
Hb F (%)	7,1 $\pm$ 4,9	5,3 $\pm$ 3,1	9,9 $\pm$ 5,6	2,3 $\pm$ 2,2	1,4 $\pm$ 1,4	0,3 $\pm$ 0,4
Hb S (%)	85,6 $\pm$ 9,9	44,6 $\pm$ 2,6	79,9 $\pm$ 4,7	57,6 $\pm$ 18,9	47,7 $\pm$ 1,3	-----
Hb D (%)	-----	43,1 $\pm$ 1,7	-----	-----	-----	-----
Hb C (%)	-----	-----	-----	-----	41,6 $\pm$ 4,9	-----

Valores de hemoglobina obtidos a partir da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Hb S β -tal*: pacientes com Hb A > 10%.

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) dos índices hematológicos e bioquímicos obtidos do hemograma dos pacientes com DF.

Parâmetros	Genótipos dos portadores da DF			
	Hb SS	Hb SD	Hb S β -tal	Hb SC
Glóbulos vermelhos (M/ μ L)	2,6 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 1,2
Hemoglobina (g/dL)	8,0 $\pm$ 1,1	8,3 $\pm$ 1,4	9,9 $\pm$ 2,0	11,8 $\pm$ 1,5
Hematócrito (%)	22,5 $\pm$ 3,3	23,2 $\pm$ 4,5	29,1 $\pm$ 5,7	34,3 $\pm$ 4,7
Reticulócitos (K/ μ L)	267,0 $\pm$ 83,1	167,6 $\pm$ 44,9	175,3 $\pm$ 71,0	140,9 $\pm$ 60,8
Reticulócitos (%)	10,6 $\pm$ 3,7	6,7 $\pm$ 1,6	5,0 $\pm$ 2,6	3,5 $\pm$ 1,7
VCM (fL)	88,5 $\pm$ 9,1	91,7 $\pm$ 6,8	72,3 $\pm$ 7,9	80,4 $\pm$ 6,3
HCM (pg)	31,2 $\pm$ 3,7	32,7 $\pm$ 1,7	24,0 $\pm$ 2,4	27,5 $\pm$ 2,5
CHCM (g/dL)	35,3 $\pm$ 1,2	35,7 $\pm$ 1,5	33,5 $\pm$ 1,1	34,2 $\pm$ 1,1
Glóbulos brancos (K/ μ L)	10,8 $\pm$ 2,8	8,5 $\pm$ 2,8	8,1 $\pm$ 3,6	7,8 $\pm$ 2,6
Plaquetas (K/ μ L)	427,3 $\pm$ 141,0	311,4 $\pm$ 85,5	337,1 $\pm$ 164,4	254,3 $\pm$ 122,5
LDH (U/L)	1113,0 $\pm$ 423,8	1459,0 $\pm$ 474,2	685,4 $\pm$ 273,7	444,6 $\pm$ 124,8
AST (U/L)	57,1 $\pm$ 19,9	62,6 $\pm$ 16,4	46,6 $\pm$ 16,0	32,0 $\pm$ 11,3
ALT (U/L)	23,6 $\pm$ 12,2	23,4 $\pm$ 13,3	29,8 $\pm$ 17,6	18,4 $\pm$ 9,6
BD (mm/dL)	0,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1
BI (mm/dL)	3,1 $\pm$ 2,0	2,3 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 1,4	1,0 $\pm$ 0,6
BT (mm/dL)	3,8 $\pm$ 1,7	3,0 $\pm$ 1,1	1,9 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 0,8

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; LDH: Lactato desidrogenase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; BT: bilirrubina total. M/ μ L: milhões por microlitro; g/dL: gramas por decilitro; fL: femtolitros; pg: picogramas; K/ μ L: mil por microlitros; U/L: unidades por litro; mm/dL: miligramas por decilitros. Valores de referência: Glóbulos vermelhos (4,0-5,9 M/ μ L); Hemoglobina (12,0-17,5 g/dL); Hematócrito (36-53%); Reticulócito absoluto ($<$ 150 K/ μ L); Reticulócito relativo (1,0-2,6%); VCM (80-100 fL); HCM (26-34 pg); CHCM (31-37 g/dL); Glóbulos brancos (5,0-10,0 K/ μ L); Plaquetas (140-400 K/ μ L). LDH ($<$ 480 U/L); AST ($<$ 31 U/L); ALT ($<$ 31 U/L); BD (0,2 mg/dL); BI ($<$ 0,7 mg/dL); BT ($<$ 1,2 mg/dL).

3.4.3 Análise dos polimorfismos

Após a genotipagem para a DF, as amostras foram submetidas a análises moleculares para rastreamento dos polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*). A técnica utilizada foi a PCR-RFLP, e os oligonucleotídeos iniciadores, bem como as enzimas de restrição e os fragmentos gerados para essas reações encontram-se sumarizados no Quadro 3. Os protocolos de rastreamento dos polimorfismos estão detalhados no APÊNDICE C.

Quadro 3. Oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e padrão de restrição observados nas análises moleculares por PCR-RFLP, para identificação dos polimorfismos avaliados no estudo.

Mutação	Primers	Segmento amplificado	Enzima de restrição	Fragmentos gerados para cada alelo
-511C/T (IL1B)	IL1B1: 5'-AAGAGGCAAAGGAGGGTGTT-3' IL1B2: 5'-GCCCTCCCTGTCTGTATTGA - 3'	498 pb	<i>AvaI</i> (5'-C↓YCGRG-3')	C: 438 pb e 60 pb T: 498 pb
-251A/T (IL8)	IL81: 5'-TTGGCTGGCTTATCTTCACC-3' IL82: 5'-GAAGCTTGTGTGCTCTGCTG-3'	446 pb	<i>MfeI</i> (5'-C↓AATTG-3')	A: 168 pb e 298 pb T: 446 pb
-308G/A (TNFA)	TNFA1: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' TNFA2: 5'-ACACTCCCCATCCTCCCGGCT-3'	117 pb	<i>NcoI</i> (5'-C↓CATGG-3')	G: 97 pb e 20 pb A: 117 pb
-509C/T (TGFB1)	TGFB1: 5'-CCGCTTCTGTCTTTCTAGG-3' TGFB2: 5' - AAAGCGGGTGATCCAGATG - 3'	406 pb	<i>Bsu36I</i> (5'-CC↓TNAGG-3')	C: 223 pb e 183 pb T: 406 pb
1772C/T (HIF1A)	HIF1A1: 5'-AAGGTGTGGCCATTGTAAACTC-3' HIF1A2: 5'-GCACTAGTAGTTTCTTTATGTATG-3'	346 pb	<i>Tsp45I</i> (5'-↓GTSAC-3')	C: 124 pb, 139 pb e 83 pb T: 263 pb e 83 pb
1790G/A (HIF1A)			<i>AciI</i> (5'-C↓CGC-3')	G: 149 pb e 197 pb A: 346 pb
-2578C/A (VEGFA)	VEGFA1: 5'-GGATGGGGCTGACTAGGTAAGC-3' VEGFA2: 5'-AAGCCCCTTTTCCTCCAAC-3'	324 pb	<i>BglII</i> (5'-A↓GATCT-3')	C: 324 pb A: 202 pb e 122 pb

pb: pares de base. N: A, T, C ou G; R: A ou G; S: C ou G; Y: C ou T.

3.4.4 Quantificação dos níveis plasmáticos das proteínas

Alíquotas de plasma foram obtidas a partir da centrifugação do sangue total a 1500 rpm durante 10 minutos e estocadas a -20°C. As análises foram realizadas por imunoensaio multiplex em LUMINEX xMAP MAGPIX (Corporação Millipore, Billerica, MA, EUA) para quantificação dos analitos TNF- α , IL-1 β , IL-8, TGF- β e VEGF. A quantificação de HIF-1 α e ANXA-1 foram realizadas por imunoensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), seguindo as instruções do fabricante. As avaliações foram efetuadas no Laboratório de Imunomorfologia, da UNESP.

As quantificações foram realizadas em número amostral menor, em relação ao total analisado quanto aos índices hemolíticos e polimorfismos, isto porque algumas amostras obtidas foram insuficientes para a realização de todos os testes ou sofreram degradação no decorrer do tempo entre a coleta e a análise. Os números amostrais dos grupos, para as quantificações plasmáticas, foram: 55 Hb AA, 67 Hb SS, oito Hb SD, 10 Hb S β -tal e 30 Hb SC.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de *Shapiro Wilk* e *Levene*, respectivamente. Os testes comparativos, de associação, correlação e regressão linear foram empregados considerando-se a parametria ou não dos dados. Em todas as análises, extremos e *outliers* foram localizados e excluídos, para evitar viés nos resultados. Quando necessário, foi realizada a transformação logarítmica dos dados, para aplicação de testes paramétricos.

Os testes comparativos de *t de Student*, *Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis* seguido pelo *post hoc* de *Dunn* e ANOVA com *post hoc* de *Tukey* foram realizados no software *Statistica* (StatSoft. Inc 2007, versão 8.0), e seus gráficos foram gerados no *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software EUA). As análises de associação, correlação e regressão foram efetuadas no software R¹. O nível de significância estatística adotado foi de $p < 0,05$.

Os testes estatísticos utilizados, em cada uma das análises, são especificados durante a exposição dos resultados.

1 R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL HEMOLÍTICO DOS GENÓTIPOS DA DF

Com a finalidade de verificar a gravidade hemolítica apresentada pelos genótipos da DF e, assim, melhor interpretar os resultados do estudo, optamos por realizar a comparação dos principais marcadores indicativos de hemólise entre os grupos.

Considerando os relatos da literatura, em que análises de componente principal sugerem como marcadores primordiais de hemólise a porcentagem de reticulócitos e os valores de LDH, AST e bilirrubina, especialmente a bilirrubina indireta (NOURAIE et al., 2013), utilizamos esses índices para realizar as análises comparativas da gravidade hemolítica entre os grupos com DF.

Os valores médios de LDH estiveram aumentados nos diferentes genótipos da DF, com exceção dos indivíduos com Hb SC, embora a média dos valores tenha sido próxima ao limite superior nesse grupo. Valores mais expressivos foram encontrados para os genótipos Hb SS ($1113,0 \pm 423,8$ U/L) e Hb SD ($1459,0 \pm 474,2$ U/L) (Figura 17A).

A porcentagem de reticulócitos mostrou-se bastante elevada em todos os grupos, mas seu aumento se destacou especialmente no genótipo Hb SS ($10,6 \pm 3,7\%$), seguido por Hb SD ($6,7 \pm 1,6\%$) e Hb S β -tal ($5,0 \pm 2,6\%$), e foi menor no grupo com Hb SC ($3,5 \pm 1,7\%$) (Figura 17B).

Os valores médios de AST estiveram acima da normalidade em todos os grupos com DF, sendo mais elevados no genótipo Hb SD ($62,6 \pm 16,4$ U/L), seguido pelo genótipo Hb SS ($57,1 \pm 19,9$ U/L). O genótipo Hb SC, por sua vez, apresentou a menor média ($32,0 \pm 11,3$), enquanto o grupo com Hb S β -tal teve valores intermediários ($46,6 \pm 16,0$ U/L) (Figura 17C).

Por fim, a bilirrubina indireta também se apresentou elevada em todos os genótipos da DF. No grupo com Hb SS foram encontrados os maiores valores ($3,1 \pm 2,0$ mm/dL), três vezes maiores do que os encontrados para o grupo com Hb SC ($1,0 \pm 0,6$ mm/dL) (Figura 17D).

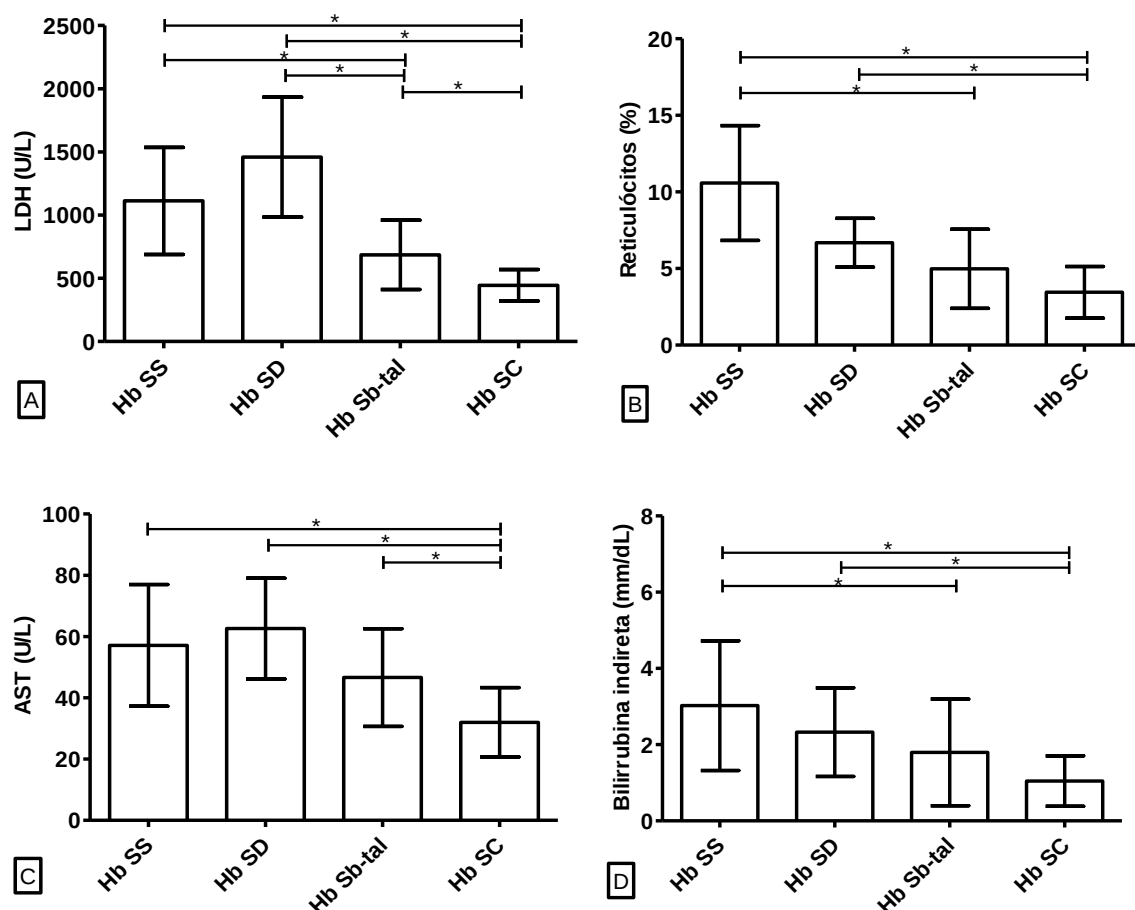


Figura 17. Comparações dos marcadores hemolíticos entre os grupos de estudo com DF. (A) LDH: Lactato desidrogenase. (B) Reticulócitos. (C) AST: aspartato aminotransferase. (D) Bilirrubina indireta. U/L: unidades por litro; mm/dL: miligramas por decilitro. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Valores de referência: LDH (< 480 U/L); Reticulócitos (1,0-2,6%); AST (< 31 U/L); bilirrubina indireta ($< 0,7$ mg/dL). Teste estatístico: *Kruskal-Wallis* seguido por *Dunn*. Nível de significância estatística: $p < 0,05$. *: indica as diferenças estatísticas, todas com $p < 0,01$.

Adicionalmente, foram realizadas análises para verificar o comportamento dos marcadores avaliados em função das variáveis idade e sexo. A frequência dos sexos não diferiu entre os grupos com DF ($p = 0,49$), mas os modelos de regressão linear, considerando idade e sexo, indicaram que indivíduos do sexo masculino apresentaram, discretamente, valores maiores de AST e bilirrubina indireta. A idade, por sua vez, não esteve relacionada a nenhum dos marcadores avaliados (Tabela 3).

No genótipo S β -tal, os quais apresentaram uma variável adicional, a Hb A, foram aplicados testes de correlação, para verificar se os parâmetros hemolíticos avaliados estavam acompanhando os valores de Hb A. Nenhuma relação, porém, foi observada e, assim, os indivíduos foram mantidos agrupados independentemente da concentração de Hb A.

Tabela 3. Influência da idade e do sexo nos marcadores de hemólise.

Marcadores	R ²	Valor de p	p (Idade)	p (Sexo)	F
Hb SS					
Reticulócitos	0,01	0,23	0,10	0,96	1,5
LDH	0,02	0,16	0,08	0,90	1,9
AST	0,01	0,68	0,56	0,63	0,4
BI	0,03	0,06	0,49	0,05	2,8
Hb SD					
Reticulócitos	0,14	0,82	0,66	0,83	0,2
LDH	0,10	0,22	0,47	0,23	1,7
AST	0,21	0,12	0,08	0,71	2,6
BI	0,34	0,04	0,08	0,02	4,4
Hb Sβ-tal					
Reticulócitos	0,08	0,92	0,89	0,69	0,1
LDH	0,01	0,44	0,35	0,35	0,9
AST	0,07	0,91	0,88	0,70	0,1
BI	0,07	0,13	0,07	0,52	2,2
Hb SC					
Reticulócitos	0,01	0,54	0,54	0,43	0,6
LDH	0,03	0,11	0,26	0,15	2,3
AST	0,11	<0,01	0,58	<0,01	6,1
BI	0,06	0,04	0,85	0,02	3,2

LDH: lactado desidrogenase. AST: aspartato aminotransferase. BI: bilirrubina indireta. Teste estatístico: Regressão Linear. Nível de significância estatística: $p < 0,05$. R²: coeficiente de determinação (varia de 0 a 1). F: força de significância da relação.

4.2 RASTREAMENTO DOS POLIMORFISMOS

Os polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*) foram investigados nas amostras de pacientes com DF e no grupo controle sem hemoglobinopatias. As frequências genotípicas e alélicas estão relacionadas nas Tabelas 4 e 5.

A investigação dos polimorfismos refere-se à etapa de análise proposta no segundo objetivo. Os dados aqui obtidos foram utilizados nas comparações propostas no quarto e no sexto objetivos, nos quais verificamos, respectivamente, a influência dos alelos normais e mutantes de cada polimorfismo nos níveis das proteínas codificadas pelos seus respectivos genes e a possível relação entre a herança dos polimorfismos e o desenvolvimento das complicações clínicas de STA e retinopatia proliferativa.

O polimorfismo 1790G/A (*HIF1A*), por estar presente em apenas um dos 320 indivíduos analisados (Tabela 5), não possibilitou a realização de análises adicionais e, por esse motivo, não foi considerado nos tópicos seguintes.

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*) e -511C/T (*TGFB1*), relacionados à via inflamatória, no grupo controle e nos genótipos da DF.

-511C/T (<i>IL1B</i>) rs16944												
Perfil de	CC		CT		TT		Total	C		T		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	24	22,4	59	55,2	24	22,4	107	107	0,50	107	0,50	214
Hb SD	7	50,0	7	50,0	0	0,0	14	21	0,75	7	0,25	28
Hb Sβ-tal	16	44,5	11	30,5	8	25,0	35	43	0,61	27	0,39	70
Hb SC	20	24,1	43	51,8	20	24,1	83	83	0,50	83	0,50	166
Hb AA	21	25,9	54	66,7	6	7,4	81	96	0,59	66	0,41	162
-251A/T (<i>IL8</i>) rs4073												
Perfil de	AA		AT		TT		Total	T		A		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	14	13,1	45	42,1	48	44,9	107	73	0,34	141	0,66	214
Hb SD	1	7,1	6	42,9	7	50,0	14	8	0,29	20	0,71	28
Hb Sβ-tal	8	22,2	18	52,8	9	25,0	35	34	0,49	36	0,51	70
Hb SC	9	10,8	40	48,2	34	41,0	83	58	0,35	108	0,65	166
Hb AA	27	33,3	37	45,7	17	21,0	81	91	0,56	71	0,44	162
-308G/A (<i>TNFA</i>) rs1800629												
Perfil de	GG		GA		AA		Total	G		A		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	86	80,4	20	18,7	1	0,9	107	192	0,90	22	0,10	214
Hb SD	10	71,4	4	28,6	0	0,0	14	24	0,86	4	0,14	28
Hb Sβ-tal	31	86,1	4	13,9	0	0,0	35	66	0,96	4	0,06	70
Hb SC	64	77,1	19	22,9	0	0,0	83	147	0,89	19	0,11	166
Hb AA	62	76,5	17	21,0	2	2,5	81	141	0,87	21	0,13	162
-509C/T (<i>TGFB1</i>) rs1800469												
Perfil de	CC		CT		TT		Total	C		T		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	54	50,5	41	38,3	12	11,2	107	149	0,70	65	0,30	214
Hb SD	6	42,9	4	28,6	4	28,6	14	16	0,57	12	0,43	28
Hb Sβ-tal	15	47,2	18	50,0	2	2,8	35	48	0,69	22	0,31	70
Hb SC	41	49,4	30	36,1	12	14,5	83	112	0,67	54	0,33	166
Hb AA	29	35,8	39	48,1	13	16,0	81	97	0,60	65	0,40	162

Hb: hemoglobina; FA: Frequência alélica.

Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos 1772C/T (*HIF1A*), 1790G/A (*HIF1A*) e -2578C/A (*VEGFA*), relacionados às vias de hipóxia e angiogênese, no grupo controle e nos genótipos da DF.

1772C/T (<i>HIF1A</i>) rs115494650												
Perfil de	CC		CT		TT		Total	C		T		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	94	87,9	10	9,3	3	2,8	107	198	0,93	16	0,07	214
Hb SD	13	92,9	1	7,1	0	0,0	14	27	0,96	1	0,04	28
Hb Sβ-tal	30	85,7	5	14,3	0	0,0	35	65	0,93	5	0,07	70
Hb SC	70	84,3	11	13,3	2	2,4	83	151	0,91	15	0,09	166
Hb AA	62	76,5	18	22,2	1	1,2	81	142	0,88	20	0,12	162
1970G/A (<i>HIF1A</i>) rs11549467												
Perfil de	GG		GA		AA		Total	G		A		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	107	100,0	0	0,0	0	0,0	107	214	1,00	0	0,00	214
Hb SD	14	100,0	0	0,0	0	0,0	14	28	1,00	0	0,00	28
Hb Sβ-tal	35	100,0	0	0,0	0	0,0	35	72	1,00	0	0,00	70
Hb SC	82	98,8	1	1,2	0	0,0	83	165	0,99	1	0,01	166
Hb AA	81	100,0	0	0,0	0	0,0	81	162	1,00	0	0,00	162
-2578C/A (<i>VEGFA</i>) rs699947												
Perfil de	CC		CA		AA		Total	C		A		Total
Hb	N	%	N	%	N	%		N	FA	N	FA	
Hb SS	60	56,1	45	42,1	2	1,9	107	165	0,77	49	0,23	214
Hb SD	9	64,3	4	28,6	1	7,1	14	22	0,79	6	0,21	28
Hb Sβ-tal	18	51,4	17	48,6	0	0,0	35	53	0,76	17	0,24	70
Hb SC	39	47,0	38	45,8	6	7,2	83	116	0,70	50	0,30	166
Hb AA	35	43,2	35	43,2	11	13,6	81	105	0,65	57	0,35	162

Hb: hemoglobina; FA: Frequência alélica.

4.3 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α E VEGF

Os marcadores relacionados à inflamação, hipóxia e angiogênese foram quantificados em amostras de plasma dos indivíduos dos grupos controle e com DF. Para as citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-8, TNF- α e TGF- β 1, e o fator de hipóxia HIF-1 α , foram observados valores médios mais elevados em portadores da DF, em comparação ao grupo controle sem hemoglobinopatias. Em relação ao anti-inflamatório endógeno ANXA1, os valores médios foram cerca de três vezes maiores no grupo controle do que no grupo com DF. Os valores médios obtidos para o marcador de angiogênese VEGF não diferiram estatisticamente entre os dois grupos (Tabela 6).

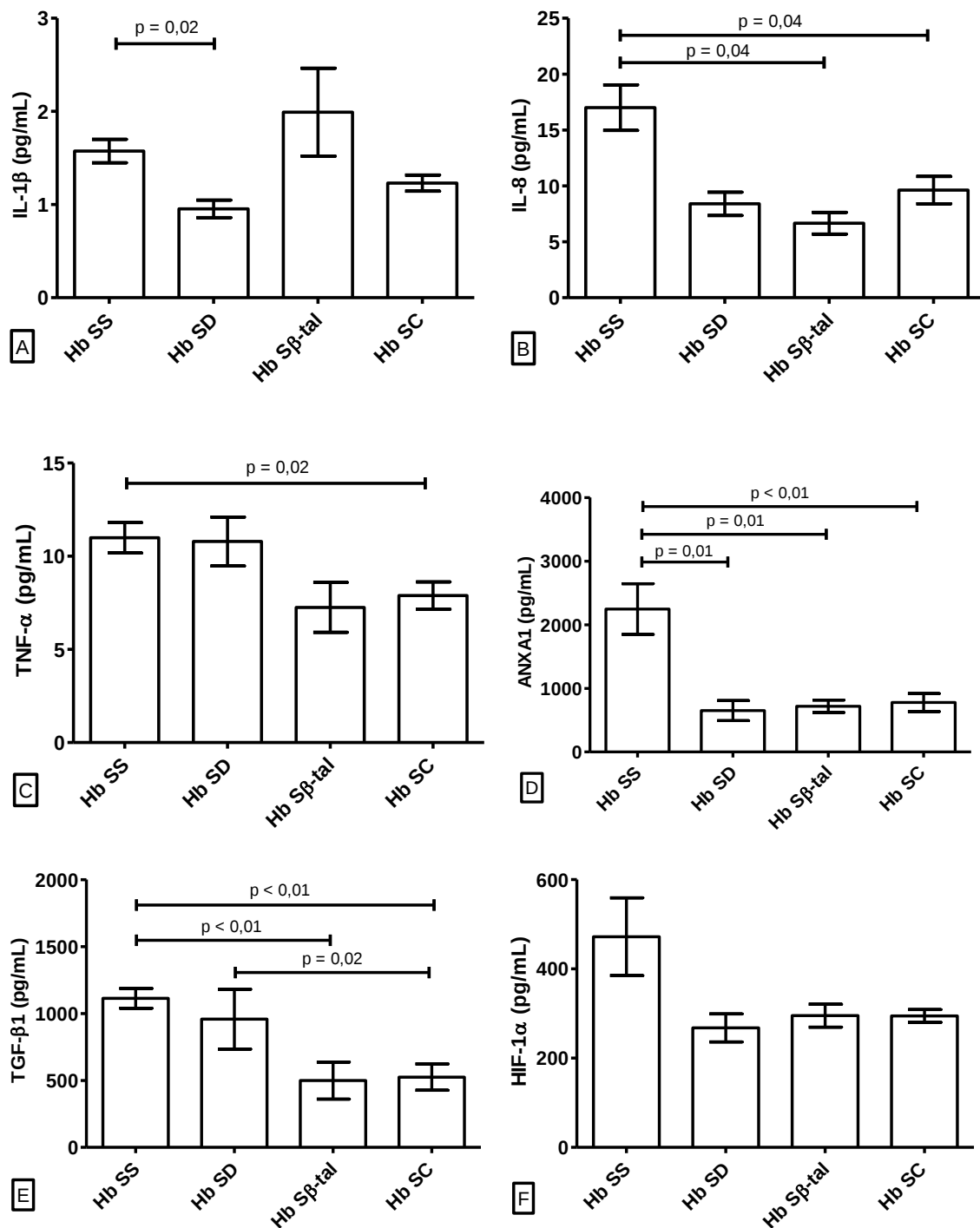
Tabela 6. Comparação dos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias e dos fatores de hipóxia e angiogênese entre o grupo controle e o grupo com DF.

Marcador	Controle (N=55)	DF (N=115)	Valor de p
IL-1 β	1,3 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	<0,01
IL-8	9,6 $\pm$ 1,0	16,2 $\pm$ 1,7	0,01
TNF- α	5,9 $\pm$ 0,3	9,8 $\pm$ 0,5	<0,01
ANXA1	3665,0 $\pm$ 1095,0	1116,0 $\pm$ 128,3	0,01
TGF- β 1	399,3 $\pm$ 35,3	958,8 $\pm$ 64,7	<0,01
HIF-1 α	289,6 $\pm$ 12,3	406,1 $\pm$ 51,8	0,04
VEGF	202,0 $\pm$ 22,8	239,7 $\pm$ 23,6	0,59

DF: Doença Falciforme. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Unidade de medida (pg/mL). Teste estatístico: *Mann-Whitney*. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

No grupo com DF, foram realizadas as comparações dos níveis plasmáticos dos marcadores entre os diferentes genótipos. Diferenças significantes foram encontradas em relação às proteínas inflamatórias IL-1 β (Figura 18A), IL-8 (Figura 18B), TNF- α (Figura 18C), ANXA1 (Figura 18D) e TGF- β 1 (Figura 18E), sendo, de forma geral, mais elevadas no genótipo Hb SS. Os níveis dos fatores de hipóxia e angiogênese, HIF-1 α (Figura 18F) e VEGF (Figura 18G), não diferiram entre os genótipos da DF.

Como análises complementares à quantificação das citocinas pró-inflamatórias, na tentativa de comprovar o estado inflamatório da DF, realizamos a comparação da quantificação de glóbulos brancos totais (Figura 19A), neutrófilos (Figura 19B) e plaquetas (Figura 19C) entre os genótipos da DF. Os três parâmetros mostraram-se maiores para o genótipo homozigoto Hb SS.



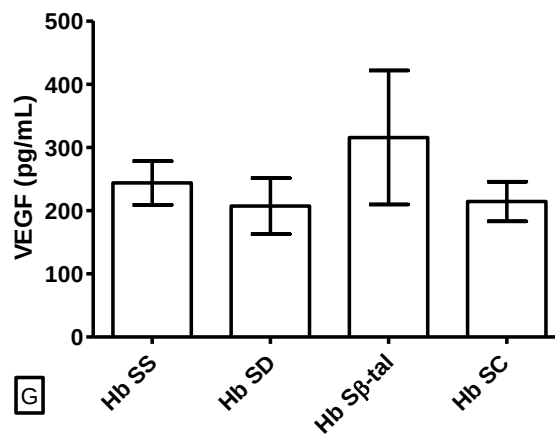


Figura 18. Comparações dos níveis plasmáticos dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese entre os genótipos da DF. (A) IL-1 β . (B) IL-8. (C) TNF- α . (D) ANXA1. (E) TGF- β 1. (F) HIF-1 α . (G) VEGF. Teste estatístico: *Kruskal-Wallis* com *pos hoc* de *Dunn*. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

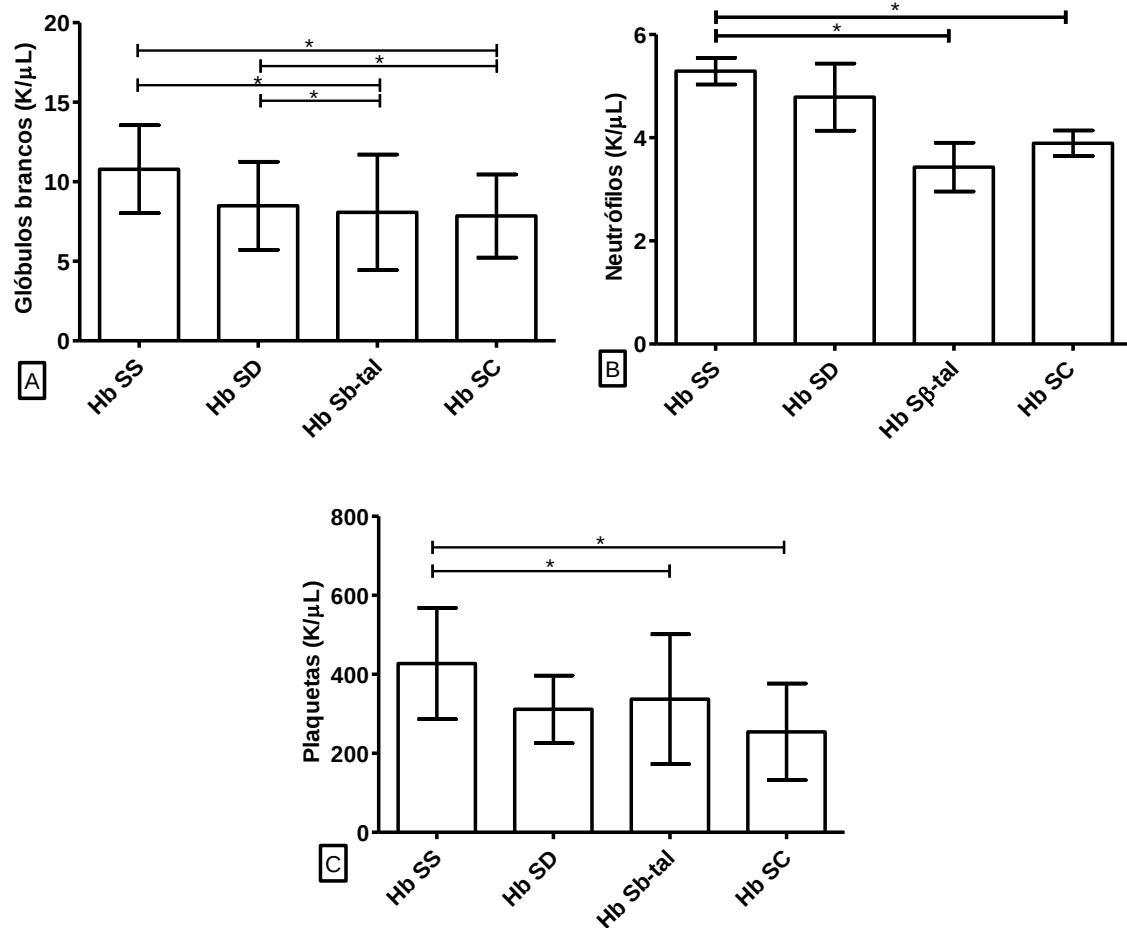


Figura 19. Comparação dos valores apresentados na quantificação de glóbulos brancos (A), neutrófilos (B) e plaquetas (C) entre os genótipos da DF. Teste estatístico: *Kruskal-Wallis* com *post hoc* de *Dunn*. Nível de significância estatística: $p < 0,05$. *: indica diferenças estatisticamente significantes, todas com $p < 0,01$.

4.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE

A influência dos polimorfismos genéticos nos valores plasmáticos das respectivas proteínas codificadas por esses genes foi verificada no grupo controle, no grupo com DF e nos diferentes genótipos da doença. As análises de associação foram realizadas considerando-se cinco modelos de herança dos polimorfismos: codominante, dominante, recessivo, sobredominante e aditivo (Tabelas 7 e 8). No modelo codominante, foi verificado o efeito de cada um dos genótipos para o polimorfismo. Nos modelos dominante e recessivo, foram avaliados os efeitos dos genótipos selvagem e homozigoto mutante, respectivamente. Enquanto, na análise sobredominante, foi considerada a influência da herança heterozigota. O modelo aditivo, por fim, avaliou o efeito aditivo de cada alelo.

Para as citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-8, TNF- α e TGF- β) e o marcador de hipóxia (HIF-1 α), não houve diferenças significantes entre os genótipos dos polimorfismos nos grupos estudados. Para o fator de angiogênese (VEGF), por outro lado, verificamos que, no grupo com DF, o genótipo Hb SS mostrou variação nos níveis plasmáticos de VEGF em função da herança do polimorfismo -2578C/A, nos modelos de herança codominante, dominante e sobredominante (Tabela 9).

A Figura 20 ilustra os valores médios de VEGF em cada genótipo. De modo geral, foi possível observar que a herança do genótipo homozigoto recessivo AA esteve associada com níveis plasmáticos menores de VEGF, enquanto a herança do alelo A em heterozigose conferiu níveis mais elevados da proteína. O genótipo selvagem CC mostrou-se com valores intermediários.

Tabela 7. Valores de p para as análises de associação entre os níveis das citocinas inflamatórias e os polimorfismos em seus respectivos genes, nos diferentes modelos de herança genética.

Modelo	Controle	Caso	Hb SS	Hb SD	Hb S β -tal	Hb SC
IL-1β e polimorfismo -511C/T (<i>IL1B</i>)						
C	0,14	0,96	0,93	0,36	0,75	0,37
D	0,05	0,92	0,72	NR	0,43	0,31
R	0,45	0,84	1,00	NR	0,79	0,61
S	0,14	0,78	0,77	NR	0,52	0,16
A	0,05	0,95	0,84	NR	0,47	0,78
IL-8 e polimorfismo -251A/T (<i>IL8</i>)						
C	0,26	0,54	0,32	0,99	0,50	0,78
D	0,10	0,29	0,13	0,93	0,24	0,48
R	0,58	0,98	0,75	0,92	0,67	0,86
S	0,25	0,31	0,20	0,98	0,43	0,60
A	0,16	0,46	0,21	0,92	0,37	0,57
TNF-α e polimorfismo -308G/A (<i>TNFA</i>)						
C	0,53	0,97	0,92	0,77	NR	0,59
D	0,29	0,94	0,86	NR	NR	NR
R	0,48	0,83	0,75	NR	NR	NR
S	0,43	0,90	0,78	NR	NR	NR
A	0,26	0,98	0,94	NR	NR	NR
TGF-β1 e polimorfismo -509C/T (<i>TGFB1</i>)						
C	0,55	0,14	0,08	0,41	0,86	0,14
D	0,47	0,10	0,15	0,77	NR	0,07
R	0,58	0,11	0,20	0,21	NR	1,00
S	0,28	0,48	0,05	0,30	NR	0,05
A	0,82	0,05	0,55	0,40	NR	0,21

C: codominante (comparação entre os três genótipos). D: dominante (genótipo selvagem *versus* genótipos heterozigoto e homozigoto mutante). R: recessivo (genótipos selvagem e heterozigoto *versus* genótipo homozigoto mutante). S: sobredominante (genótipos selvagem e homozigoto mutante *versus* genótipo heterozigoto). A: aditivo (ação direta de cada alelo). NR: análise estatística não realizada, devido ao baixo número amostral. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

Tabela 8. Valores de p para as análises de associação entre os níveis dos marcadores de hipóxia e angiogênese e os polimorfismos em seus respectivos genes, nos diferentes modelos de herança genética.

Modelo	Controle	Caso	Hb SS	Hb SD	Hb Sβ-tal	Hb SC
HIF-1α e polimorfismo 1772C/T (HIF1A)						
C	0,14	0,85	0,59	NR	0,19	0,09
D	0,05	0,90	0,92	NR	NR	NR
R	0,45	0,64	0,36	NR	NR	NR
S	0,14	0,71	0,59	NR	NR	NR
A	0,05	0,95	0,65	NR	NR	NR
VEGF e polimorfismo -2578C/A (VEGFA)						
C	0,26	0,06	0,04	0,32	0,48	0,57
D	0,10	0,04	0,03	NR	NR	0,29
R	0,58	0,43	0,38	NR	NR	0,94
S	0,25	0,02	0,01	NR	NR	0,31
A	0,16	0,13	0,11	NR	NR	0,38

C: codominante (comparação entre os três genótipos). D: dominante (genótipo selvagem *versus* genótipos heterozigoto e homozigoto mutante). R: recessivo (genótipos selvagem e heterozigoto *versus* genótipo homozigoto mutante). S: sobredominante (genótipos selvagem e homozigoto mutante *versus* genótipo heterozigoto). A: aditivo (ação direta de cada alelo). NR: análise estatística não realizada, devido ao baixo número amostral. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

Tabela 9. Resultado detalhado da análise de associação entre os níveis plasmáticos de VEGF (pg/mL) e o polimorfismo -2578C/A (VEGFA), nos modelos de herança codominante, dominante e sobredominante.

Modelo	Comparação	VEGF (pg/mL)	p
C	CC	210,0 ± 42,5	0,04
	CA	432,0 ± 94,9	
	AA	59,9 ± 8,5	
D	CC	210,6 ± 42,5	0,03
	CA+AA	405,2 ± 89,8	
S	CC+AA	203,4 ± 40,8	0,01
	CA	432,8 ± 94,9	

C: codominante. D: dominante. S: sobredominante. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

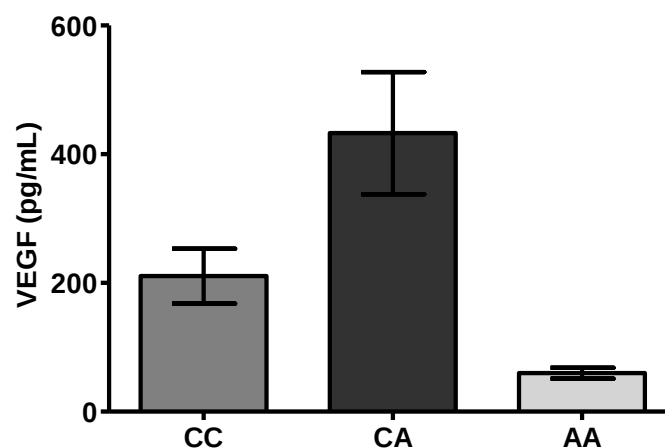


Figura 20. Níveis plasmáticos de VEGF nos genótipos do polimorfismo -2578C/A (VEGFA), no grupo com Hb SS.

Com a finalidade de verificar os efeitos da interação das duas variáveis genéticas (genótipos que determinam a DF e polimorfismos genéticos) nos valores plasmáticos médios dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese, aplicamos o teste de ANOVA *fatorial*.

Nas comparações entre os grupos controle e com DF, foi observado que os valores das citocinas inflamatórias variaram em função da condição clínica (DF), mas não em função dos polimorfismos genéticos dos marcadores avaliados. Já os valores de VEGF, não mostraram diferenças em função da doença, mas, sim, em relação ao polimorfismo herdado. Os níveis de HIF-1 α não mostraram diferença significativa para nenhuma das duas variáveis (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado da análise de ANOVA *fatorial* para a influência dos polimorfismos genéticos e da DF, simultaneamente, nos valores plasmáticos médios dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese.

Marcador	Influência do polimorfismo		Influência da DF	
	(p)	F	(p)	F
IL-1 β	0,64	0,4	0,04	3,9
IL-8	0,74	0,3	0,02	5,5
TNF- α	0,93	0,1	0,01	21,9
TGF- β 1	0,43	0,8	<0,01	34,8
HIF-1 α	0,48	0,7	0,35	0,9
VEGF	0,03	3,5	0,38	0,8

F: força de significância do teste. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

As mesmas análises foram realizadas entre os genótipos da DF (Tabela 11). Os valores de HIF-1 α diferiram entre os grupos em função do genótipo da doença, mas não em razão do polimorfismo. Já as diferenças entre os níveis plasmáticos de VEGF foram devidas ao polimorfismo -2578C/A, mas não ao genótipo da DF.

Interações significantes entre as duas variáveis não foram observadas para nenhum dos marcadores analisados.

Tabela 11. Resultado da análise de ANOVA fatorial para a influência dos polimorfismos genéticos e dos genótipos da DF, simultaneamente, nos valores médios plasmáticos dos marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese.

Marcador	Influência do polimorfismo (p)	F	Influência do genótipo da DF (p)	F
IL-1 β	0,96	0,1	0,40	1,0
IL-8	0,53	0,6	0,06	2,5
TNF- α	0,91	0,1	0,12	2,0
TGF- β 1	0,12	2,1	0,01	3,7
HIF-1 α	0,84	0,1	0,30	1,2
VEGF	0,04	3,0	0,44	0,9

F: força de significância do teste. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

4.5 RELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE

A relação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese foi analisada por testes de Correlação de *Spearman*, nos grupos controle (Figura 21) e com DF (Figura 22). As relações com significância estatística estão detalhadas na Tabela 12. Foram observadas correlações positivas entre IL-1 β e IL8; IL-1 β e VEGF; IL-8 e VEGF; TNF- α e HIF-1 α , e entre TNF- α e VEGF, em ambos os grupos. Outras cinco correlações, também positivas, ocorreram apenas nos indivíduos com DF, sendo elas IL-1 β e TGF- β 1; IL-8 e TNF- α ; IL-8 e TGF- β 1, ANXA1 e TGF- β 1, e HIF-1 α e VEGF. Uma correlação negativa foi observada no grupo com DF, entre ANXA1 e VEGF. Das 11 correlações significantes observadas no grupo com DF, em sete delas o genótipo Hb SS estava presente.

Nas comparações em que foram observadas relações significantes entre as variáveis, descritas acima, foram aplicadas análises de regressão linear para verificar a dependência entre elas. No grupo com DF, todas as regressões foram ajustadas para o genótipo da DF, uma vez que a intensidade da inflamação entre eles é variável, conforme observado na análise dos níveis plasmáticos das proteínas (Figura 18). Além disso, as regressões que envolveram os níveis de VEGF foram ajustadas, também, para o polimorfismo -2578C/A, em virtude da relação encontrada entre o SNP e os valores obtidos nas quantificações da proteína (Tabelas 9, 10 e 11).

As regressões mostraram que o TNF- α influenciou nos valores de IL-8 (Figura 23), HIF-1 α (Figura 24) e VEGF (Figura 25), enquanto a IL-1 β exerceu influência nos valores de IL-8 (Figura 26), TGF- β 1 (Figura 27) e VEGF (Figura 28). A IL-8, além de mostrar-se responsiva às citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , foi, também, indutora de TGF- β 1 (Figura 29) e VEGF (Figura 30). A ANXA foi responsiva aos níveis plasmáticos de TGF- β 1 (Figura 31) e de VEGF (Figura 32). O VEGF, por fim, respondeu a todas as citocinas pró-inflamatórias, à ANXA1 e ao HIF-1 α (Figura 33). Por convenção estatística, a construção dos gráficos obedeceu à disposição, no eixo y, das variáveis consideradas dependentes, enquanto as variáveis independentes foram plotadas no eixo x. A relação de significância observada nas onze correlações, mencionadas acima, manteve-se nas análises de regressão linear, porém, nem todas as variáveis que estiveram relacionadas no grupo com DF, foram significantes para o grupo controle. Na DF, o genótipo Hb SS apresentou mais relações de dependência entre os marcadores, do que os demais genótipos.

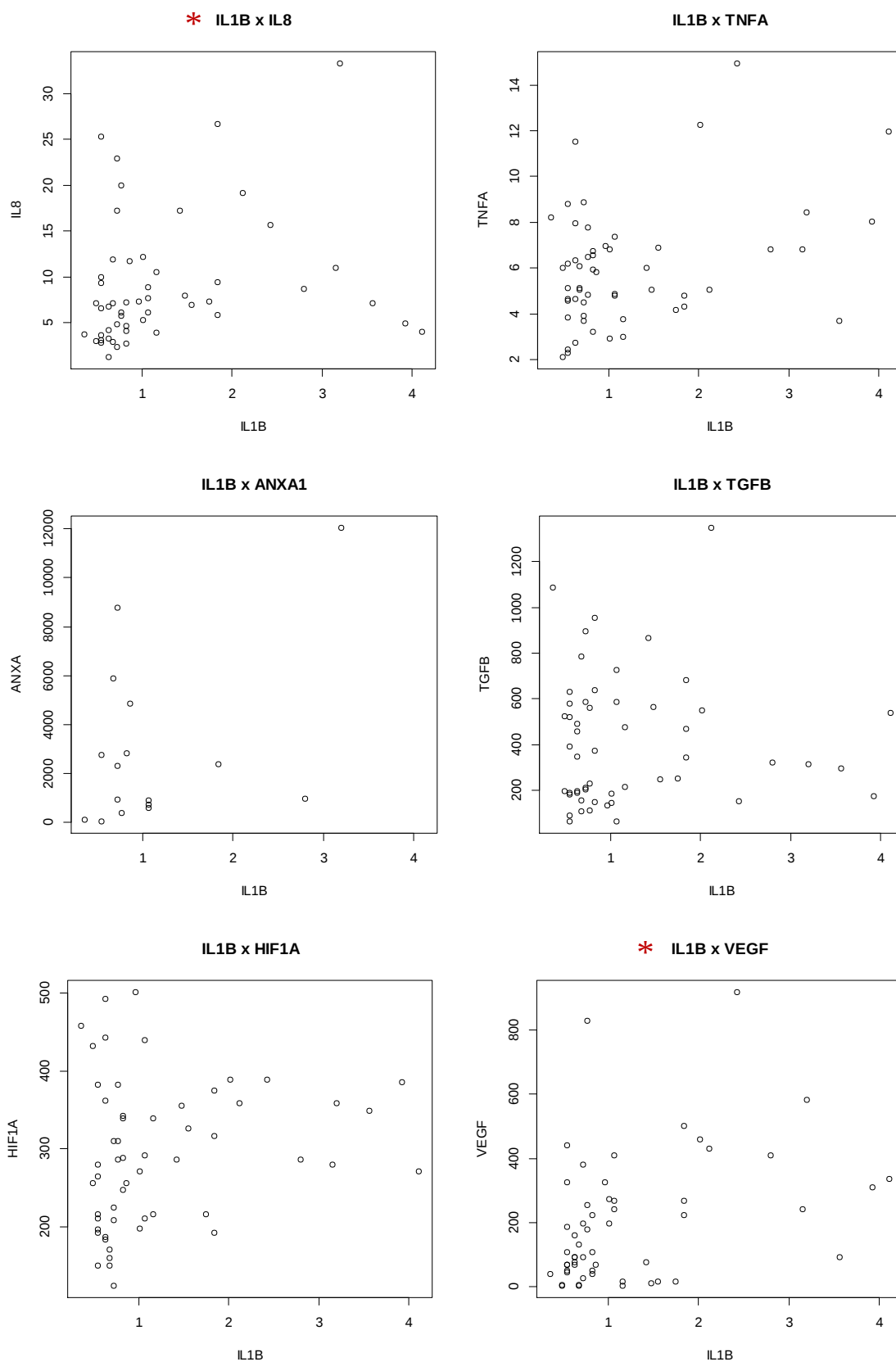


Figura 21. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo controle sem hemoglobinopatias. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

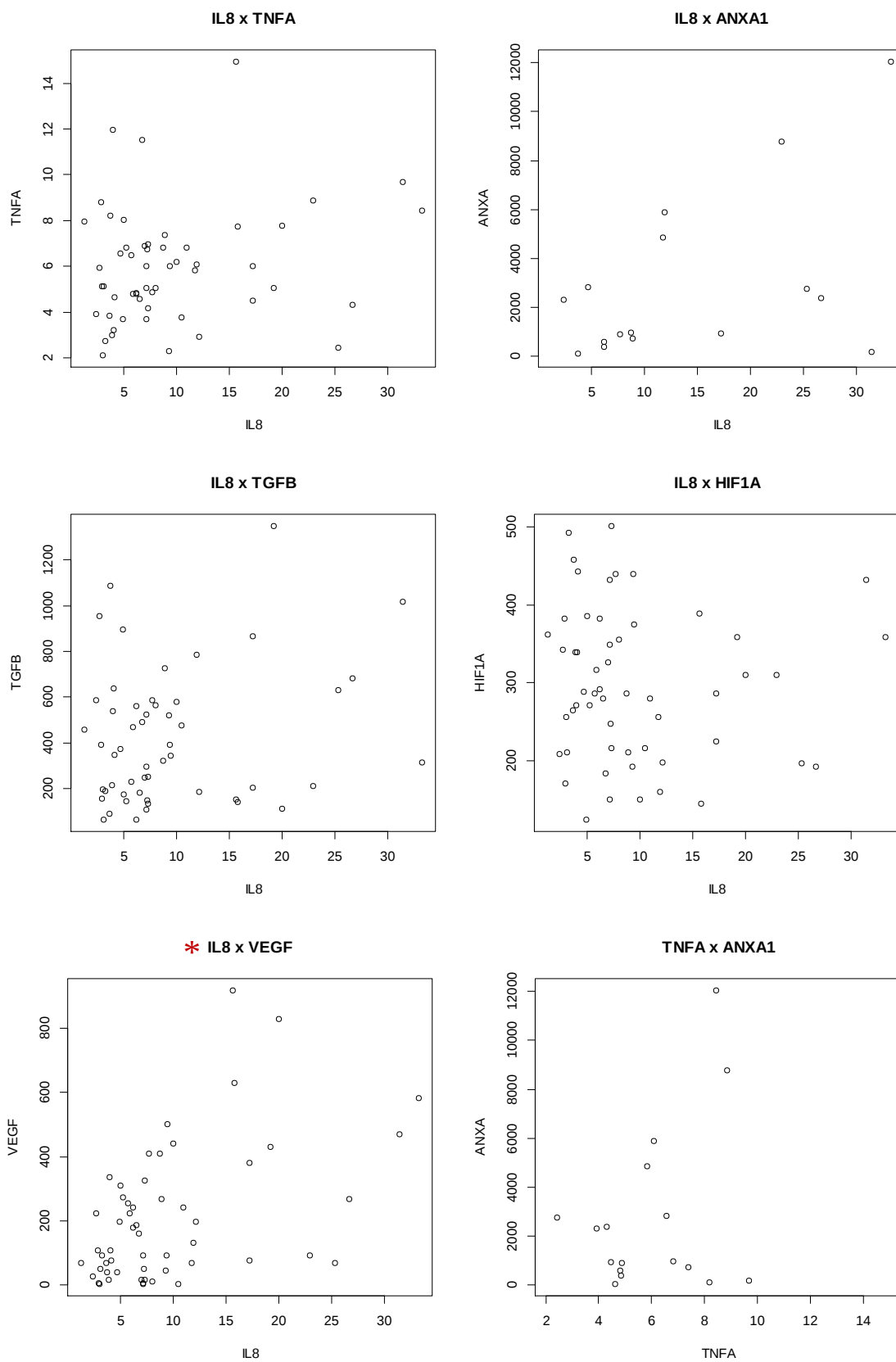


Figura 21 [Continuação]. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo controle sem hemoglobinopatias. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

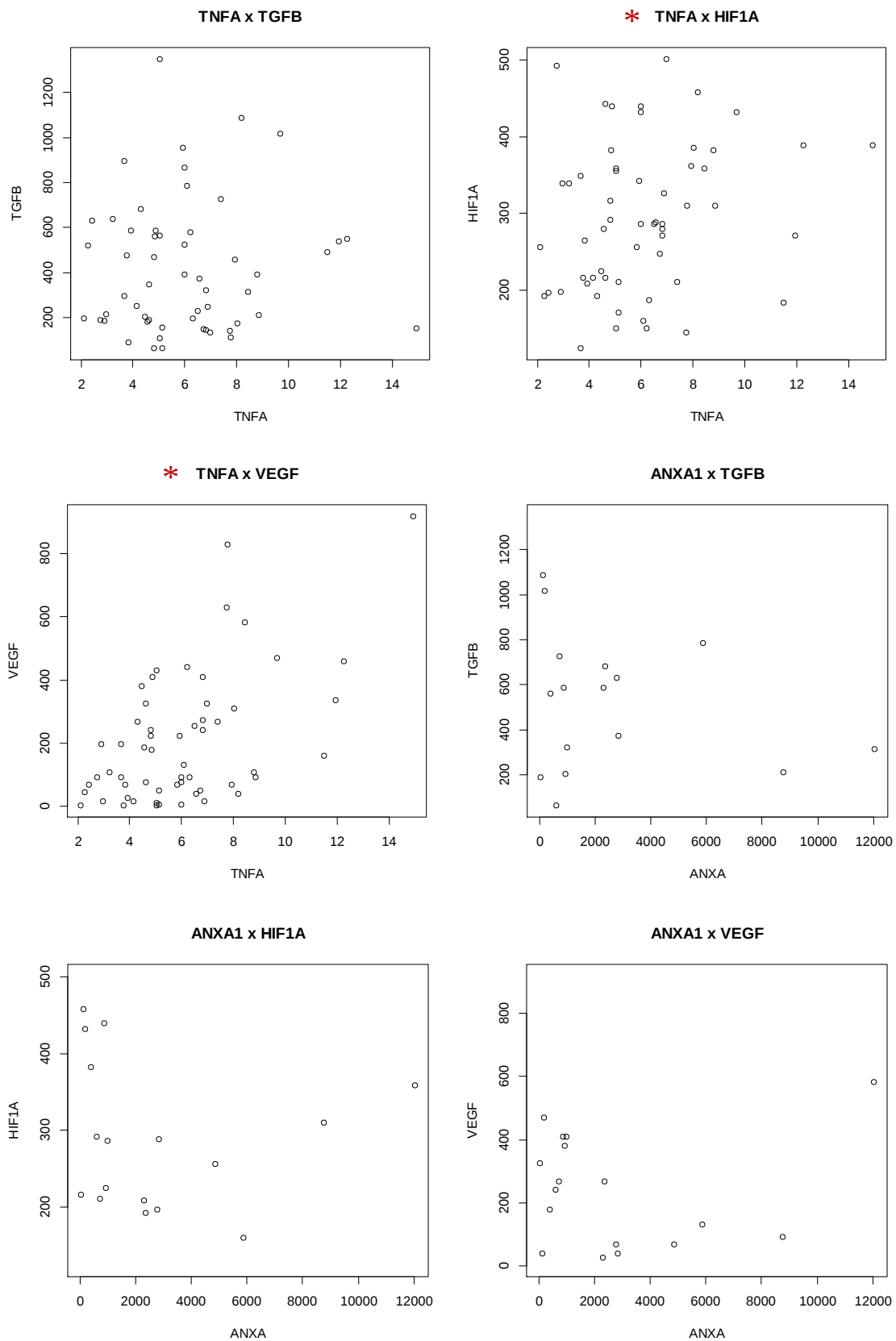


Figura 21 [Continuação]. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo controle sem hemoglobinopatias. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

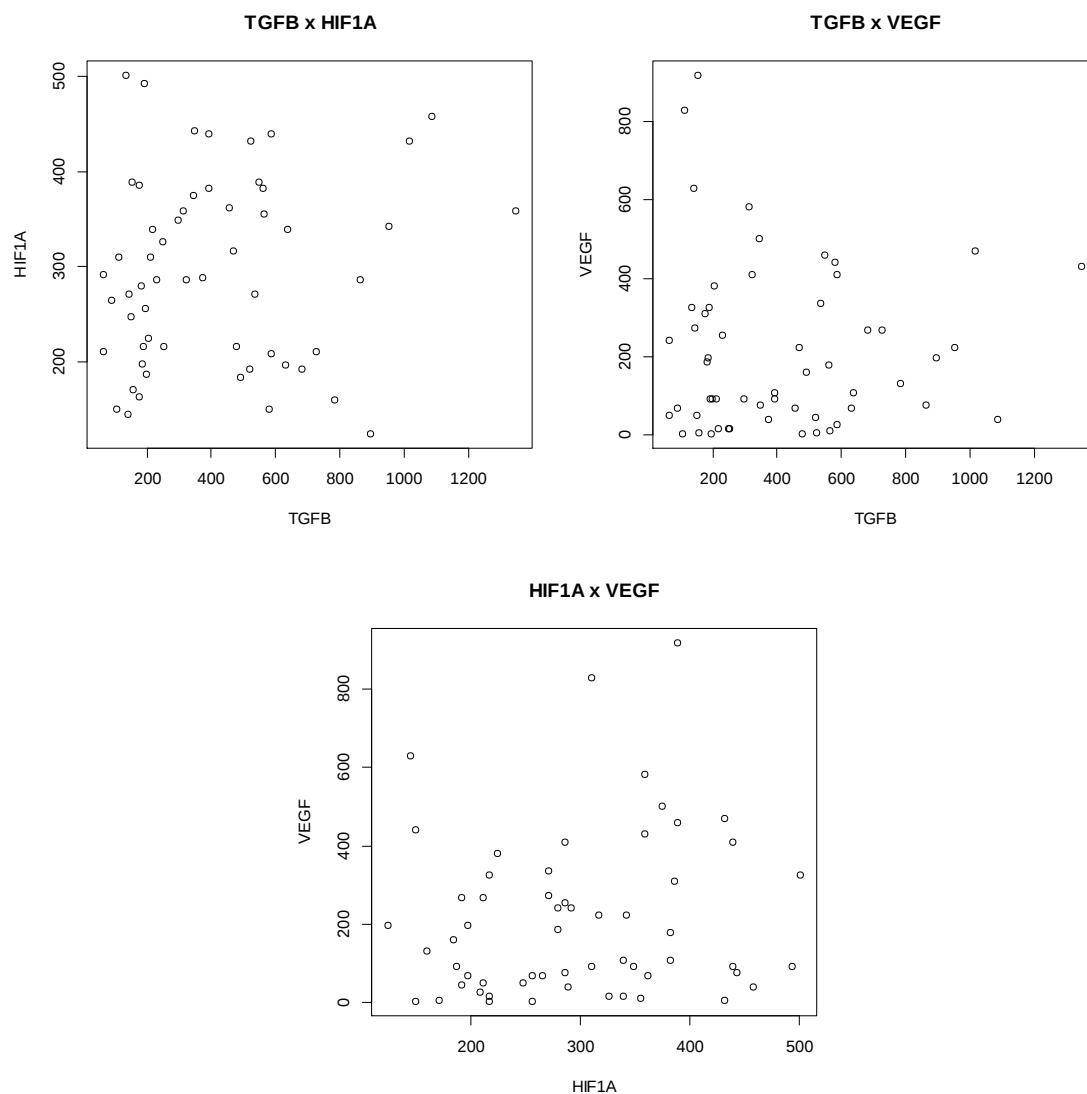


Figura 21 [Continuação]. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo controle sem hemoglobinopatias. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

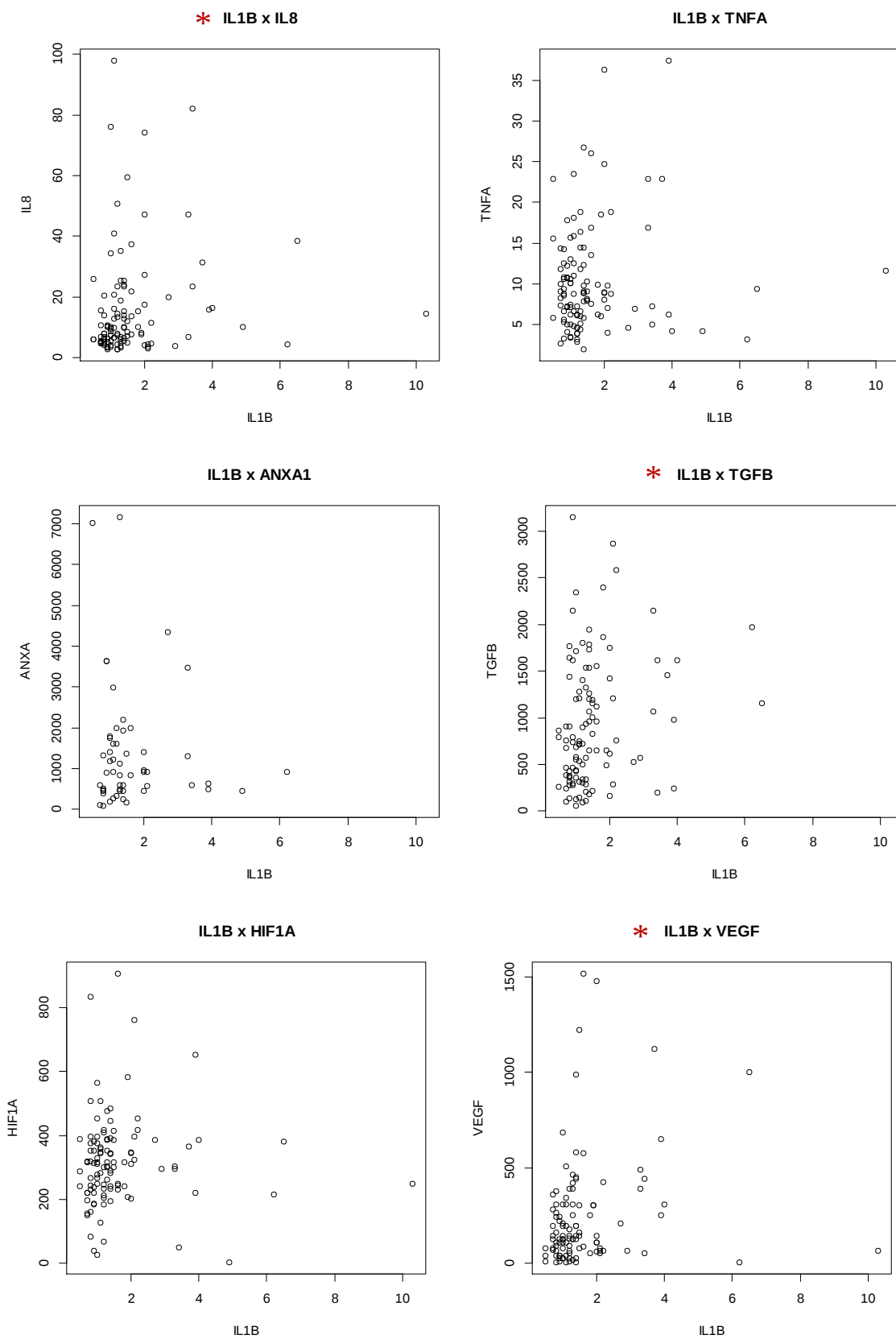


Figura 22. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo com DF. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

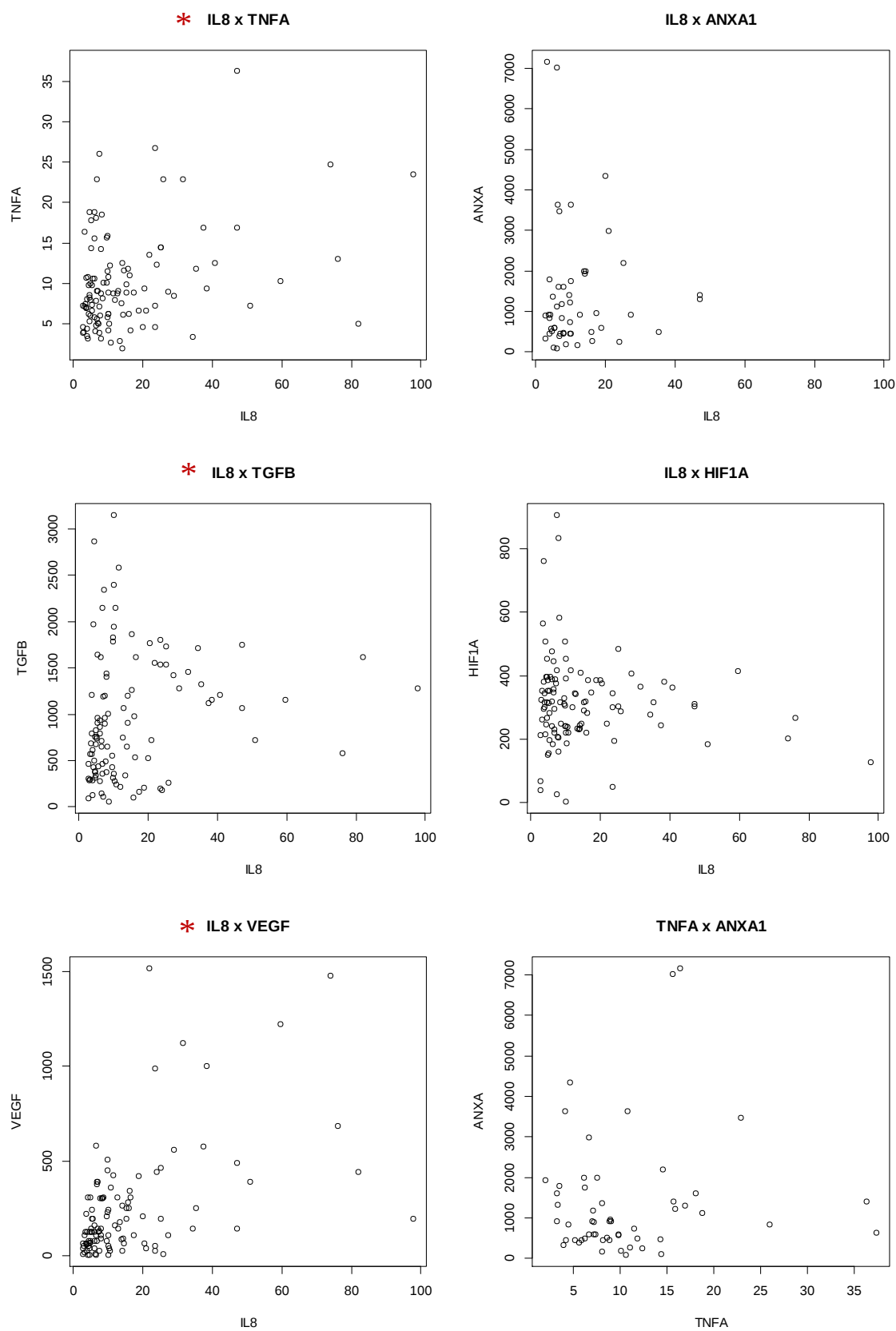


Figura 22. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo com DF. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

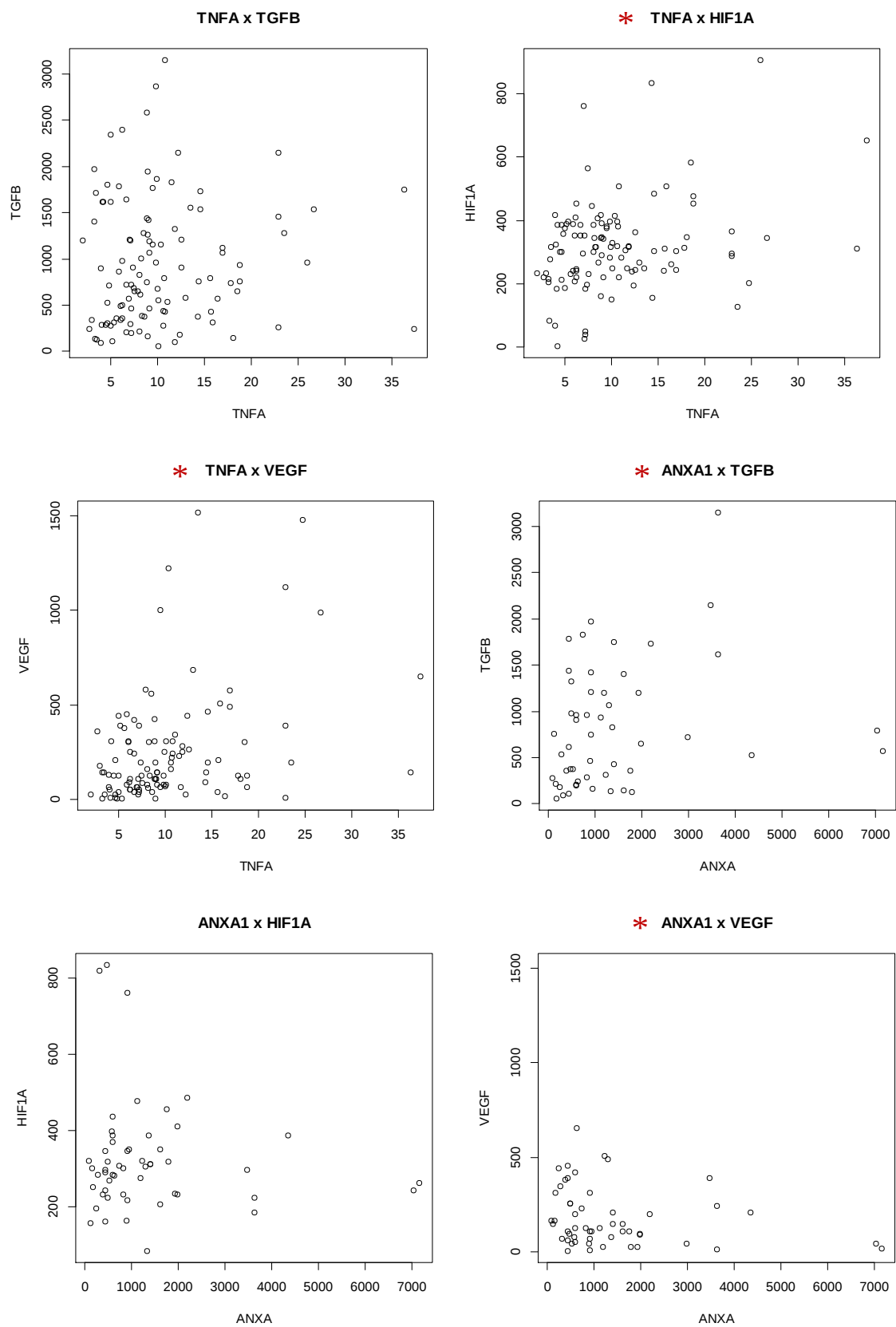


Figura 22 [Continuação]. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo com DF. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

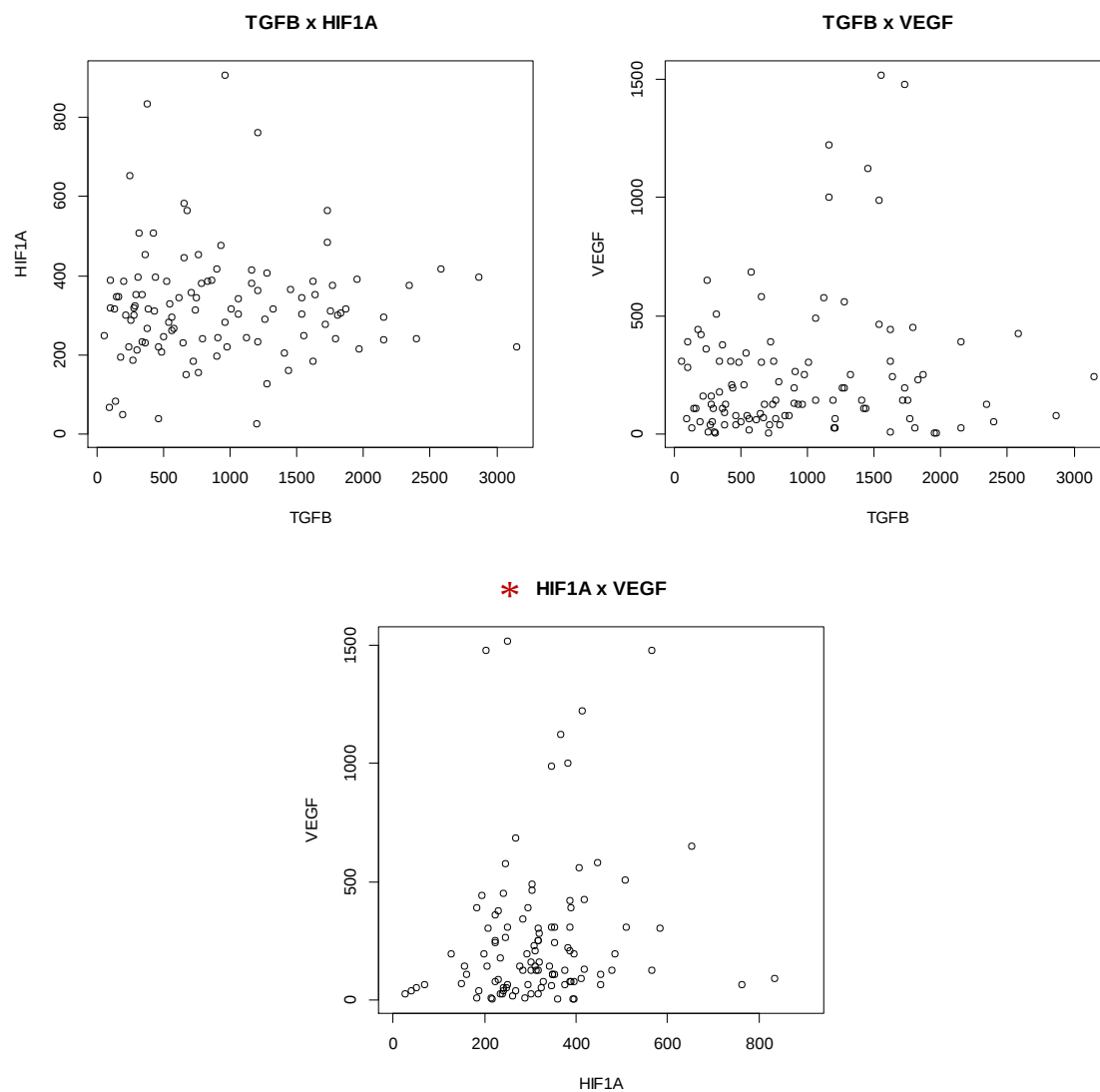


Figura 22 [Continuação]. Gráficos de correlação entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese no grupo com DF. *:indica as relações significantes, que estão especificadas na Tabela 20.

Tabela 12. Resultados das correlações significantes encontradas entre os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese, no grupo controle e na DF.

Comparações	Resultados das correlações (r e valor de p)		
	Grupo controle	Grupo com DF	Genótipos da DF
IL-1 β x IL-8	r = 0,36	r = 0,27	SS (r = 0,25; p = 0,04)
	p <0,01	p <0,01	SD (r = 0,75; p = 0,04)
IL-1 β x TGF- β 1	ns	r = 0,28	SC (r = 0,40; p = 0,04)
		p <0,01	
IL-1 β x VEGF	r = 0,42	r = 0,23	SS (r = 0,27; p = 0,03)
	p <0,01	p = 0,01	SD (r = 0,75; p = 0,04)
IL-8 x TNF- α	ns	r = 0,26	SS (r = 0,24; p = 0,04)
		p <0,01	
IL-8 x TGF- β 1	ns	r = 0,30	SS (r = 0,43; p <0,01)
		p <0,01	
IL-8 x VEGF	r = 0,43 p <0,01	r = 0,48 p < 0,01	SS (r = 0,37; p <0,01)
			S β (r = 0,76; p = 0,03)
			SC (r = 0,80; p <0,01)
TNF- α x HIF-1 α	r = 0,26	r = 0,21	S β (r = 0,70; p = 0,02)
	p = 0,04	p=0,03	
TNF- α x VEGF	r = 0,43	r = 0,32	SS (r = 0,27; p = 0,02)
	p <0,01	p <0,01	
ANXA1 x TGF- β 1	ns	r = 0,31	S β (r = 0,70; p = 0,03)
		p = 0,02	
ANXA1 x VEGF	ns	r = -0,28	SS (r = -0,46; p = 0,03)
		p = 0,04	
HIF-1 α x VEGF	ns	r = 0,19	S β (r = 0,81; p <0,01)
		p = 0,04	

Teste estatístico: Correlação de *Spearman*. Nível de significância estatística: p<0,05. ns: não significativa. r = coeficiente de correlação. r < 0,3 (correlação fraca); 0,31 < r <0,70 (correlação moderada); r > 0,71 (correlação forte). Valores de r positivos: indicam correlações positivas. Valores de r negativos: indicam correlações negativas.

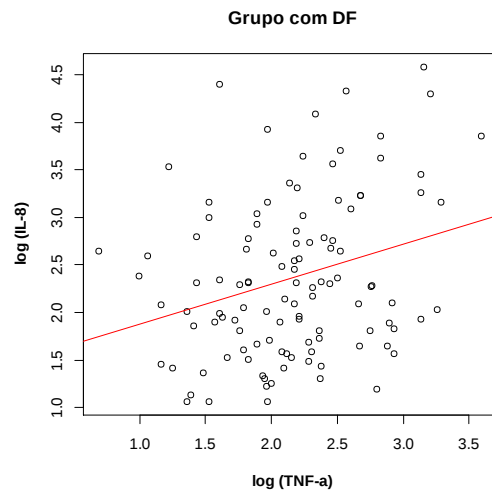


Figura 23. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-8 e TNF- α no grupo com DF: $R^2 = 0,12$; $p < 0,01$; $F = 4,9$.

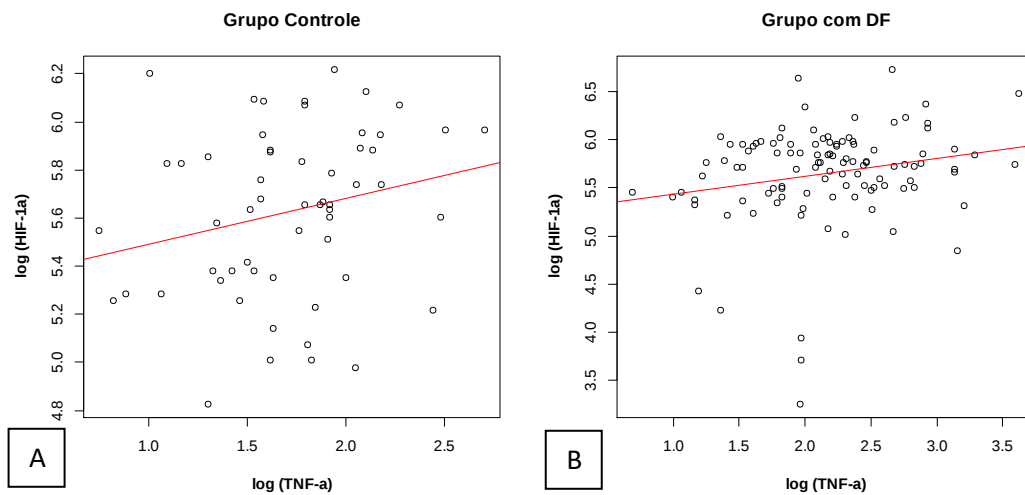


Figura 24. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de TNF- α e HIF-1 α . (A) Grupo controle: $R^2 = 0,04$; $p = 0,08$; $F = 3,1$. (B) Grupo com DF: $R^2 = 0,23$; $p < 0,01$; $F = 9,2$.

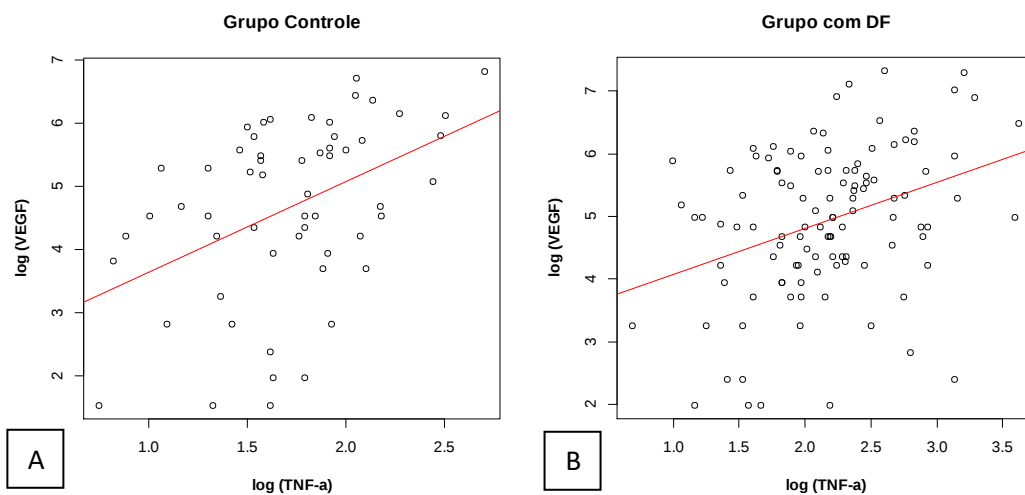


Figura 25. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de TNF- α e VEGF. (A) Grupo controle: $R^2 = 0,18$; $p < 0,01$; $F = 13,0$. (B) Grupo com DF: $R^2 = 0,12$; $p < 0,01$; $F = 3,6$.

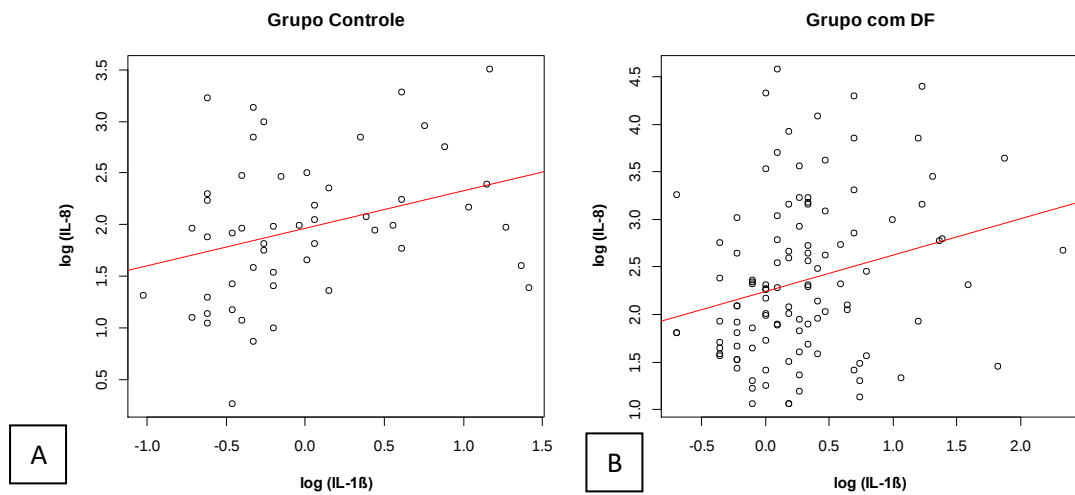


Figura 26. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-8. (A) Grupo controle: $R^2 = 0,10$; $p = 0,02$; $F = 5,8$. (B) Grupo com DF: $R^2 = 0,10$; $p = 0,01$; $F = 3,4$.

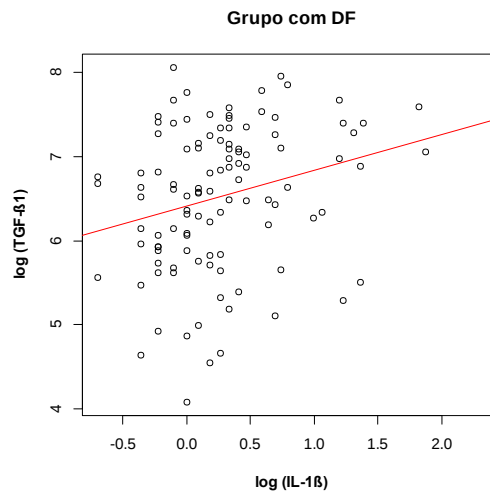


Figura 27. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e TGF- $\beta 1$ no grupo com DF: $R^2 = 0,26$; $p < 0,01$; $F = 10,3$.

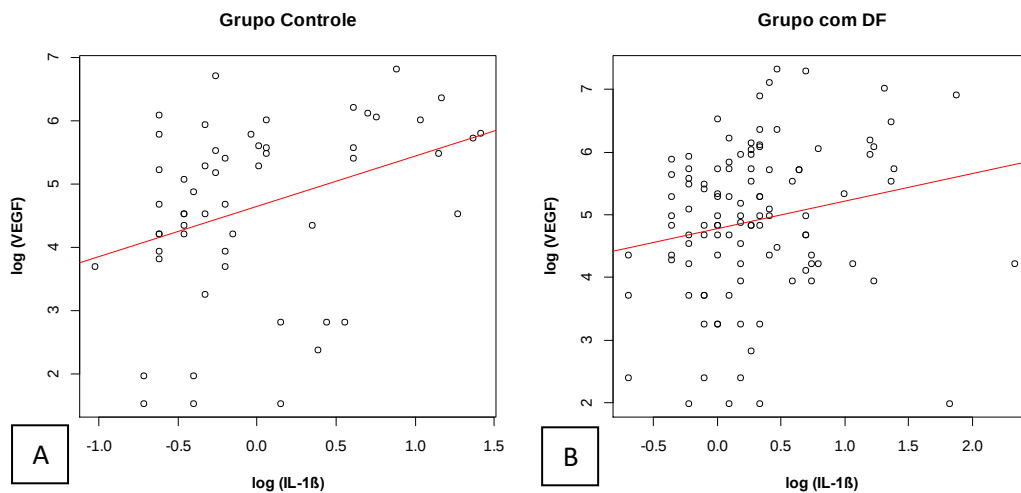


Figura 28. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-1 β e VEGF. (A) Grupo controle: $R^2 = 0,11$; $p = 0,01$; $F = 7,5$. (B) Grupo com DF: $R^2 = 0,05$; $p = 0,04$; $F = 2,0$.

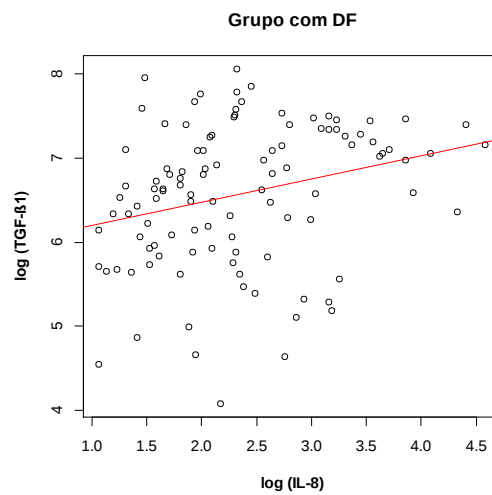


Figura 29. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-8 e TGF- β 1 no grupo com DF: $R^2 = 0,21$; $p < 0,01$; $F = 8,1$.

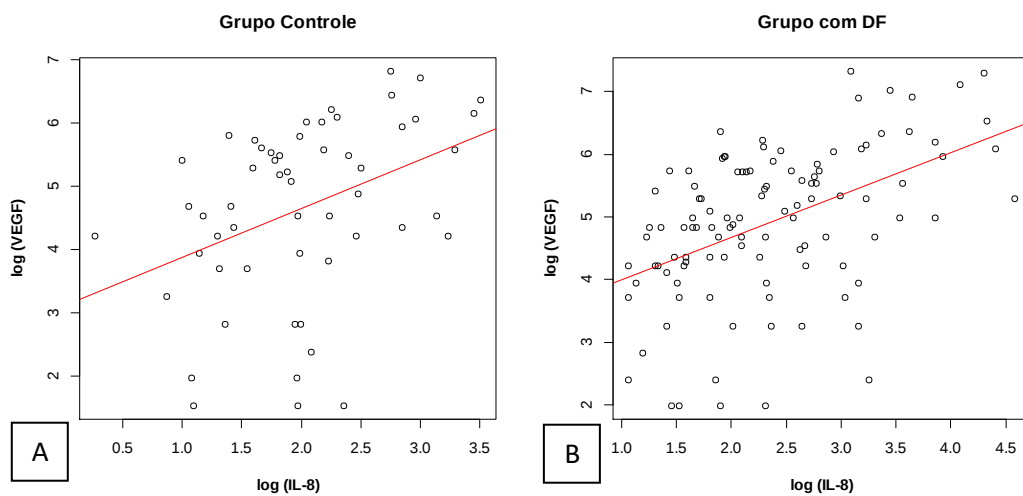


Figura 30. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de IL-8 e VEGF. (A) Grupo controle: $R^2 = 0,14$; $p < 0,01$; $F = 9,6$. (B) Grupo com DF: $R^2 = 0,26$; $p < 0,01$; $F = 7,3$.

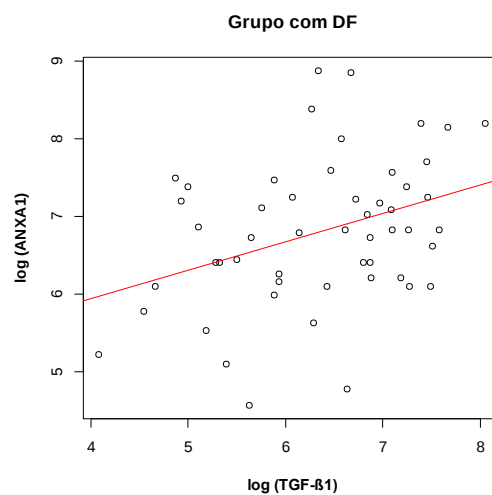


Figura 31. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de ANXA1 e TGF- β 1 no grupo com DF: $R^2 = 0,23$; $p < 0,01$; $F = 4,8$.

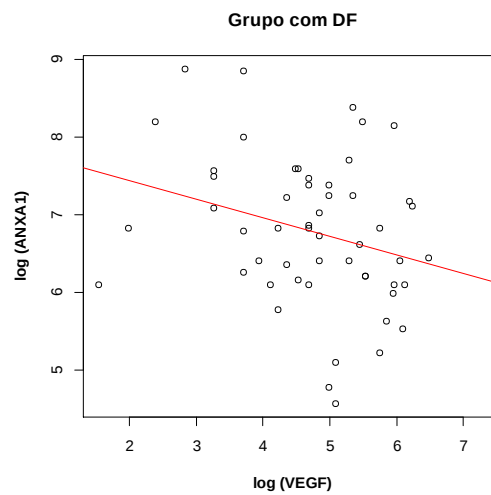


Figura 32. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de ANXA1 e VEGF no grupo com DF: $R^2 = 0,33$; $p < 0,01$; $F = 7,35$.

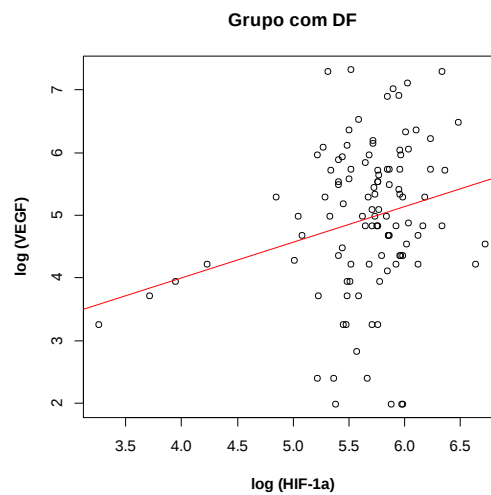


Figura 33. Regressão linear entre os níveis plasmáticos de HIF-1 α e VEGF no grupo com DF: $R^2 = 0,21$; $p < 0,01$; $F = 8,1$.

4.6 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE EM STA E RETINOPATIA PROLIFERATIVA

A ocorrência de STA e retinopatia proliferativa foram levantadas a partir de informações clínicas obtidas durante análise dos prontuários. Os dados coletados estão sumarizados na Tabela 13. Podemos observar que a ocorrência de STA foi maior em pacientes com genótipo Hb SS, enquanto a retinopatia proliferativa foi mais frequente naqueles com genótipo Hb SC. As comparações estatísticas desses valores entre os genótipos da DF são apresentadas na Tabela 14.

Quanto à frequência de ocorrência de STA entre os genótipos da DF, foi observada diferença significativa ($p < 0,01$) entre os genótipos Hb SS (45,8%) e Hb SC (21,7%), perfazendo uma ocorrência de 1,8 vezes maior de STA no genótipo homozigoto. Outras duas diferenças foram encontradas na frequência de retinopatia proliferativa entre o genótipo Hb SC (24,1%) e os genótipos Hb SS (7,5%) e Hb S β -tal (2,8%), sendo essa frequência, respectivamente, 3,2 e 8,0 vezes maior na herança de Hb SC ($p < 0,01$ e $p = 0,01$) (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13. Distribuição da ocorrência das manifestações fenotípicas STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Grupos	N	STA				Retinopatia Proliferativa			
		Presença		Ausência		Presença		Ausência	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Hb SS	107	49	45,8	58	54,2	8	7,5	99	92,5
Hb SD	14	4	28,6	10	71,4	1	7,1	13	92,9
Hb S β -tal	35	9	25,7	26	74,3	1	2,8	34	97,1
Hb SC	83	18	21,7	65	78,3	20	24,1	63	75,9
Total	239	80	33,5	159	66,5	30	12,5	198	87,5

STA: síndrome torácica aguda.

Tabela 14. Comparações estatísticas entre os genótipos da DF em decorrência da presença ou ausência de STA e retinopatia proliferativa.

Grupos	STA				Retinopatia Proliferativa			
	Hb	SS	SD	Sβ-tal	SC	SS	SD	Sβ-tal
SS	----	0,26	0,05	<0,01	----	1,00	0,45	<0,01
SD	0,26	----	1,00	0,73	1,00	----	0,49	0,29
Sβ-tal	0,05	1,00	----	0,63	0,45	0,49	----	0,01
SC	<0,01	0,73	0,63	----	<0,01	0,29	0,01	---

STA: síndrome torácica aguda. Testes estatísticos: Qui-quadrado e Exato de *Fisher*. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

Tendo em vista a maior frequência de STA nos portadores do genótipo Hb SS e, da mesma forma, de retinopatia proliferativa no grupo Hb SC, aplicamos um modelo de regressão logística, de razão de chances (*Odds Ratio* – OR), para verificar a influência desses dois genótipos (Hb SS e Hb SC) no desenvolvimento das manifestações fenotípicas estudadas. O teste corresponde à avaliação da chance de ocorrência de determinado evento (no caso, as manifestações fenotípicas) em função de uma condição específica (genótipos da DF). No primeiro caso, foi observada chance 2,7 vezes maior de portadores do genótipo Hb SS apresentarem STA, em relação aos demais genótipos ($OR=2,7$; $1,6 < IC_{95\%} < 4,8$; $p < 0,01$). Nos casos de retinopatia proliferativa, essa chance foi 4,6 vezes maior para o genótipo Hb SC, em comparação às outras formas de herança da DF ($OR=4,6$; $2,0 < IC_{95\%} < 10,5$; $p < 0,01$).

Alguns parâmetros adicionais, como hemoglobina total, valores percentuais de Hb F, quantificação de células vermelhas e hematócrito já foram descritos estarem relacionados à ocorrência de retinopatia proliferativa (FOX et al., 1990; LEVEZIEL et al., 2011). Por essa razão, também comparamos esses valores em nossos grupos de estudo. Observamos, no grupo com Hb SC, menores valores de Hb F e maiores valores de hemoglobina total, glóbulos vermelhos e hematócrito (Figura 34A-D).

Análises de associação foram realizadas a fim de verificar alguma possível relação entre a presença dos polimorfismos genéticos e as complicações clínicas abordadas neste estudo: STA e retinopatia proliferativa, em cada um dos grupos com DF. Não foram observadas associações estatisticamente significantes entre a herança do alelo mutante para os polimorfismos e o aparecimento das manifestações fenotípicas nos diferentes genótipos da DF (Tabelas 15 a 20). As análises foram realizadas considerando-se tanto a herança do alelo em heterozigose, quanto em homozigose. Para alguns grupos de genótipos com

menor número amostral, não foi possível executar os testes estatísticos e, por esse motivo, os valores das análises não são mostrados.

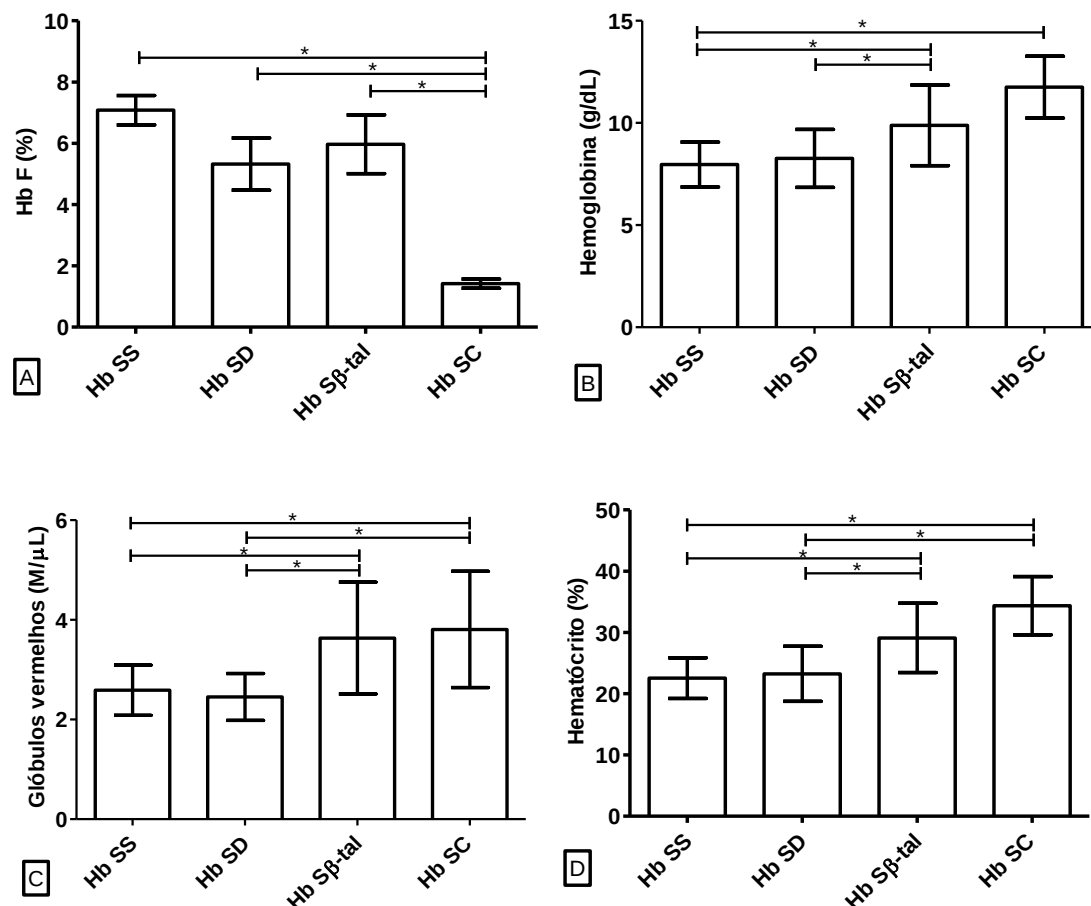


Figura 34. Análise dos parâmetros relacionados à ocorrência de retinopatia proliferativa na DF. (A) Hb F. (B) Hemoglobina total. (C) Quantificação de glóbulos vermelhos. (D) Hematócrito. g/dL: gramas por decilitro. M/μL: mil por microlitro. Teste estatístico: *Kruskal-Wallis* seguido por *Dunn*. Nível de significância estatística: $p < 0,05$. *:indica as diferenças estatísticas, todas com $p < 0,01$.

Os níveis das citocinas inflamatórias e dos fatores responsivos à hipóxia foram avaliados em pessoas com e sem histórico de STA (Tabela 21), e com e sem o desenvolvimento de retinopatia proliferativa (Tabela 22). Não foram encontradas diferenças entre a presença e a ausência das manifestações clínicas quanto aos níveis plasmáticos dos marcadores.

Tabela 15. Prevalência do polimorfismo -511C/T (*IL1B*) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Genótipos da DF	Genótipos -511C/T (<i>IL1B</i>)	Total de casos	Casos positivos de STA		Casos positivos de Retinopatia		Odds Ratio STA:			Odds Ratio Retinopatia:		
			de STA		de Retinopatia		CT+TT (caso) x CC (controle) TT (caso) x CC+CT (controle)			CT+TT (caso) x CC (controle) TT (caso) x CC+CT (controle)		
			N	%	N	%	OR	IC	p	OR	IC	p
Hb SS	CC	24	12	50,0	2	8,3	0,80	0,3-2,0	0,81	0,9	0,2-4,5	0,80
	CT	59	28	47,5	4	6,9	0,65	0,2-1,6	0,49	1,2	0,2-6,2	0,80
	TT	24	9	37,5	2	8,3						
Hb SD	CC	7	2	28,6	1	14,3	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	CT	7	2	28,6	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	TT	0	0	0,0	0	0,0						
Hb Sβ-tal	CC	16	4	25,0	1	6,3	1,1	0,2-4,9	0,76	NR	NR	0,93
	CT	11	4	33,3	0	0,0	0,3	0,1-3,2	0,61	NR	NR	0,51
	TT	8	1	12,5	0	0,0						
Hb SC	CC	20	7	35,0	3	17,6	0,6	0,2-2,0	0,64	2,0	0,5-7,9	0,45
	CT	43	8	18,6	9	20,9	0,6	0,1-2,2	0,60	2,8	0,9-8,5	0,11
	TT	20	3	17,6	8	38,1						
Total	CC	67	25	31,3	7	10,5	0,8	0,4-1,4	0,53	1,3	0,5-3,2	0,70
	CT	120	42	52,5	13	10,8	0,6	0,3-1,2	0,19	1,9	0,8-4,5	0,18
	TT	52	13	16,2	10	18,9						

STA: Síndrome Torácica Aguda

OR: *Odds Ratio* (equivale a chance de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do alelo polimórfico/mutante em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: alelo associado positivamente com a manifestação; OR<1: alelo associado negativamente com a manifestação; OR=1: alelo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística: p<0,05. NR: análise estatística não realizada, devido ao número amostral nulo ou reduzido.

Tabela 16. Prevalência do polimorfismo -251A/T (*IL8*) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Genótipos da DF	Genótipos -251A/T (<i>IL8</i>)	Total de casos	Casos positivos de STA		Casos positivos de Retinopatia		Odds Ratio STA:			Odds Ratio Retinopatia:		
							AT+TT (caso) x AA (controle)			AT+TT (caso) x AA (controle)		
							TT (caso) x AA+AT (controle)			TT (caso) x AA+AT (controle)		
			N	%	N	%	OR	IC	p	OR	IC	p
Hb SS	AA	48	19	39,6	3	6,2	1,6	0,7-3,4	0,33	1,4	0,3-6,1	0,95
	AT	45	24	53,3	5	11,1	0,9	0,3-2,7	0,96	NR	NR	NR
	TT	14	6	42,8	0	0,0						
Hb SD	AA	7	1	14,3	0	0,0	4,5	NR	0,55	NR	NR	NR
	AT	6	2	33,3	1	16,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	TT	1	1	100,0	0	0,0						
Hb Sβ-tal	AA	8	3	37,5	0	0,0	0,5	0,1-2,6	0,68	NR	NR	NR
	AT	18	5	27,8	0	0,0	0,3	0,1-2,6	0,47	NR	NR	NR
	TT	9	1	11,1	1	11,1						
Hb SC	AA	34	5	14,7	9	26,5	1,9	0,6-6,1	0,39	0,8	0,3-2,2	0,87
	AT	40	9	22,5	10	25,0	3,4	0,8-14,4	0,18	0,4	0,1-3,1	0,58
	TT	9	4	44,4	1	11,1						
Total	AA	97	28	28,9	12	12,4	1,4	0,8-2,5	0,27	1,0	0,5-2,2	0,90
	AT	109	40	36,7	16	14,7	1,2	0,5-2,5	0,86	0,4	0,1-1,8	0,35
	TT	33	12	36,4	2	6,1						

STA: Síndrome Torácica Aguda

OR: *Odds Ratio* (equivale a chance de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do alelo polimórfico/mutante em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: alelo associado positivamente com a manifestação; OR<1: alelo associado negativamente com a manifestação; OR=1: alelo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística: p<0,05. NR: análise estatística não realizada, devido ao número amostral nulo ou reduzido.

Tabela 17. Prevalência do polimorfismo -308G/A (*TNFA*) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Genótipos da DF	Genótipos -308G/A (<i>TNFA</i>)	Total de casos	Casos positivos de STA		Casos positivos de Retinopatia		Odds Ratio STA:			Odds Ratio Retinopatia:		
			GA+AA (caso) x GG (controle)		AA (caso) x GG+GA (controle)		GA+AA (caso) x GG (controle)			AA (caso) x GG+GA (controle)		
			N	%	N	%	OR	IC	p	OR	IC	p
Hb SS	GG	86	38	44,2	6	7,0	1,4	0,5-3,6	0,67	1,4	0,3-7,5	0,95
	GA	20	10	50,0	2	9,5	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	1	1	100,0	0	0,0						
Hb SD	GG	10	3	30,0	1	10,0	0,8	NR	0,64	NR	NR	NR
	GA	4	1	25,0	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	0	0	0,0	0	0,0						
Hb Sβ-tal	GG	31	7	22,6	1	3,2	3,4	0,4-28,9	0,57	NR	NR	NR
	GA	4	2	50,0	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	0	0	0,0	0	0,0						
Hb SC	GG	64	13	20,3	13	20,3	1,4	0,4-4,6	0,80	2,3	0,7-3,0	0,24
	GA	19	5	26,3	7	36,8	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	0	0	0,0	0	0,0						
Total	GG	191	61	31,9	21	11,0	1,4	0,7-2,7	0,40	0,8	0,3-1,8	0,71
	GA	47	18	38,3	9	18,2	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	1	1	100,0	0	0,0						

STA: Síndrome Torácica Aguda

OR: *Odds Ratio* (equivale a chance de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do alelo polimórfico/mutante em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: alelo associado positivamente com a manifestação; OR<1: alelo associado negativamente com a manifestação; OR=1: alelo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística: p<0,05. NR: análise estatística não realizada, devido ao número amostral nulo ou reduzido.

Tabela 18. Prevalência do polimorfismo -509C/T (*TGFB1*) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Genótipos da DF	Genótipos -509C/T (<i>TGFB1</i>)	Total de casos	Casos positivos de STA		Casos positivos de Retinopatia		Odds Ratio STA: CT+TT (caso) x CC (controle) TT (caso) x CC+CT (controle)			Odds Ratio Retinopatia: CT+TT (caso) x CC (controle) TT (caso) x CC+CT (controle)		
			N	%	N	%	OR	IC	p	OR	IC	p
Hb SS	CC	54	24	44,4	5	9,3	1,1	0,5-2,3	0,99	0,6	0,1-2,6	0,73
	CT	41	18	43,9	2	4,9	1,8	0,5-6,0	0,54	1,1	0,1-10,2	0,64
	TT	12	7	58,3	1	8,3						
Hb SD	CC	6	1	16,7	0	0,0	3,0	NR	0,80	NR	NR	NR
	CT	4	1	25,0	1	25,0	4,0	NR	0,64	NR	NR	NR
	TT	4	2	50,0	0	0,0						
Hb Sβ-tal	CC	15	4	26,7	1	6,7	0,9	0,2-4,2	0,78	NR	NR	NR
	CT	18	5	27,8	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	TT	2	0	0,0	0	0,0						
Hb SC	CC	41	5	12,2	12	29,3	3,2	1,0-10,1	0,07	1,1	0,4-2,8	0,89
	CT	30	9	30,0	5	16,7	2,0	0,5-7,7	0,50	1,0	0,2-4,4	0,77
	TT	12	4	33,3	3	25,0						
Total	CC	116	34	29,3	18	27,3	1,4	0,8-2,5	0,24	0,6	0,3-1,3	0,25
	CT	93	33	35,5	8	8,6	1,6	0,7-3,5	0,31	1,1	0,3-3,3	0,87
	TT	30	13	43,3	4	13,3						

STA: Síndrome Torácica Aguda

OR: *Odds Ratio* (equivale a chance de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do alelo polimórfico/mutante em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: alelo associado positivamente com a manifestação; OR<1: alelo associado negativamente com a manifestação; OR=1: alelo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística: p<0,05. NR: análise estatística não realizada, devido ao número amostral nulo ou reduzido.

Tabela 19. Prevalência do polimorfismo -1772C/T (*HIF1A*) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Genótipos da DF	Genótipos -2578C/A (<i>VEGFA</i>)	Total de casos	Casos positivos de STA		Casos positivos de Retinopatia		Odds Ratio STA:			Odds Ratio Retinopatia:		
			CT+TT (caso) x CC (controle)		TT (caso) x CC+CT (controle)		CT+TT (caso) x CC (controle)			TT (caso) x CC+CT (controle)		
			N	%	N	%	OR	IC	p	OR	IC	p
Hb SS	CC	94	43	45,7	6	6,4	1,0	0,3-3,2	0,79	2,7	0,5-14,9	0,56
	CT	10	3	30,0	1	10	NR	NR	NR	6,9	0,6-86,1	0,54
	TT	3	3	100,0	1	33,3						
Hb SD	CC	13	4	30,8	1	7,7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	CT	1	0	0,0	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	TT	0	0	0,0	0	0,0						
Hb Sβ-tal	CC	30	9	30,0	1	3,3	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	CT	5	0	0,0	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	TT	0	0	0,0	0	0,0						
Hb SC	CC	70	16	22,8	18	26,9	0,6	0,1-3,1	0,82	0,5	0,1-2,6	0,65
	CT	11	1	9,1	2	18,2	3,8	0,2-63,3	0,90	NR	NR	NR
	TT	2	1	50,0	0	0,0						
Total	CC	207	72	34,8	26	12,6	0,63	0,3-1,5	0,37	1,0	0,3-3,1	0,78
	CT	27	4	14,8	3	11,1	8,3	0,9-75,6	0,08	1,8	0,2-16,4	0,86
	TT	5	4	80,0	1	20,0						

STA: Síndrome Torácica Aguda

OR: *Odds Ratio* (equivale a chance de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do alelo polimórfico/mutante em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: alelo associado positivamente com a manifestação; OR<1: alelo associado negativamente com a manifestação; OR=1: alelo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística: p<0,05. NR: análise estatística não realizada, devido ao número amostral nulo ou reduzido.

Tabela 20. Prevalência do polimorfismo -2578C/A (VEGFA) na ocorrência de STA e retinopatia proliferativa nos genótipos da DF.

Genótipos da DF	Genótipos -2578C/A (VEGFA)	Total de casos	Casos positivos de STA		Casos positivos de Retinopatia		Odds Ratio STA:			Odds Ratio Retinopatia:		
			CA+AA (caso) x CC (controle)		AA (caso) x CC+CA (controle)		CA+AA (caso) x CC (controle)			AA (caso) x CC+CA (controle)		
			N	%	N	%	OR	IC	p	OR	IC	p
Hb SS	CC	60	23	38,3	3	5,0	2,0	0,9-4,3	0,12	2,3	0,5-10,0	0,46
	CA	45	24	53,3	5	11,1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	2	2	100,0	0	0,0						
Hb SD	CC	9	2	22,2	0	0,0	2,3	NR	0,93	NR	NR	NR
	CA	4	2	50,0	1	33,3	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	1	0	0,0	0	0,0						
Hb Sβ-tal	CC	17	3	17,6	1	5,9	0,5	0,1-1,8	0,50	NR	NR	NR
	CA	18	6	33,3	0	0,0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	AA	0	0	0,0	0	0,0						
Hb SC	CC	39	9	7,7	9	23,1	0,9	0,3-2,4	0,98	1,1	0,4-3,1	0,96
	CA	38	8	5,3	9	23,7	0,7	0,1-6,5	0,84	1,6	0,3-9,7	0,96
	AA	6	1	16,7	2	33,3						
Total	CC	125	37	29,6	13	10,4	1,4	0,8-2,5	0,23	1,5	0,7-3,3	0,38
	CA	105	40	38,1	15	14,4	1,0	0,2-4,1	0,73	2,0	0,4-10,4	0,71
	AA	9	3	33,3	2	22,2						

STA: Síndrome Torácica Aguda

OR: *Odds Ratio* (equivale a chance de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do alelo polimórfico/mutante em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: alelo associado positivamente com a manifestação; OR<1: alelo associado negativamente com a manifestação; OR=1: alelo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística: p<0,05. NR: análise estatística não realizada, devido ao número amostral nulo ou reduzido.

Tabela 21. Comparações dos valores médios plasmáticos dos marcadores avaliados nos grupos com DF na presença ou ausência de STA.

Marcador	Hb SS		P	Hb SD		P	Hb S β -tal		P	Hb SC		P
	STA+	STA-		STA+	STA-		STA+	STA-		STA+	STA-	
IL-1β	1,5 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,3	0,78	0,8 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,05	2,3 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 0,5	1,00	1,9 $\pm$ 1,6	1,3 $\pm$ 0,2	0,15
IL-8	24,3 $\pm$ 5,1	17,9 $\pm$ 3,3	0,23	7,1 $\pm$ 1,0	8,9 $\pm$ 2,0	0,66	9,1 $\pm$ 0,8	5,2 $\pm$ 1,0	0,07	7,9 $\pm$ 2,4	11,7 $\pm$ 1,9	0,12
TNF-α	9,7 $\pm$ 1,0	11,9 $\pm$ 1,2	0,16	12,5 $\pm$ 1,8	9,3 $\pm$ 2,2	0,38	9,1 $\pm$ 3,5	13,4 $\pm$ 5,0	0,65	8,4 $\pm$ 1,6	7,7 $\pm$ 0,8	0,89
ANXA1	1268,5 $\pm$ 277,0	2875,0 $\pm$ 578,8	0,05	444,3 $\pm$ 127,7	925,7 $\pm$ 278,1	0,28	951,8 $\pm$ 253,1	617,8 $\pm$ 75,0	0,30	996,4 $\pm$ 228,6	585,5 $\pm$ 154,5	0,19
TGF-β1	1385,0 $\pm$ 148,0	1097,0 $\pm$ 117,8	0,07	1100,0 $\pm$ 326,0	814,8 $\pm$ 337,7	0,49	756,5 $\pm$ 440,5	425,5 $\pm$ 139,3	0,33	608,6 $\pm$ 217,7	465,3 $\pm$ 105,1	0,77
HIF-1α	384,2 $\pm$ 39,7	340,9 $\pm$ 19,4	0,84	364,3 $\pm$ 160,4	312,6 $\pm$ 25,2	0,48	294,4 $\pm$ 13,5	370,5 $\pm$ 82,0	0,27	286,2 $\pm$ 29,8	288,1 $\pm$ 18,6	0,87
VEGF	339,9 $\pm$ 86,7	250,2 $\pm$ 45,0	0,97	144,3 $\pm$ 30,7	270,3 $\pm$ 73,9	0,24	179,6 $\pm$ 164,3	233,6 $\pm$ 99,9	0,38	136,8 $\pm$ 53,9	228,8 $\pm$ 36,5	0,10

STA+: casos positivos para síndrome torácica aguda. STA-: casos negativos para síndrome torácica aguda. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Teste estatístico: Mann-Whitney. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

Tabela 22. Comparações dos valores médios plasmáticos dos marcadores avaliados nos grupos com DF na presença ou ausência de retinopatia proliferativa.

Marcador	Hb SS		P	Hb SD		P	Hb S β -tal		P	Hb SC		P
	RP+	RP-		RP+	RP-		RP+	RP-		RP+	RP-	
IL-1β	1,1 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2	0,16	0,7 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1	0,21	3,9 $\pm$ 0,0	1,8 $\pm$ 0,5	0,40	1,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	0,59
IL-8	11,4 $\pm$ 3,8	20,4 $\pm$ 3,0	0,52	5,2 $\pm$ 0,0	8,9 $\pm$ 1,1	0,38	----	6,7 $\pm$ 1,0	----	11,9 $\pm$ 3,5	10,3 $\pm$ 1,7	0,38
TNF-α	12,7 $\pm$ 2,5	10,9 $\pm$ 0,9	0,54	14,4 $\pm$ 0,0	10,3 $\pm$ 1,4	0,38	37,4 $\pm$ 0,0	9,3 $\pm$ 2,4	0,16	8,3 $\pm$ 1,7	7,8 $\pm$ 0,8	0,80
ANXA1	2050,7 $\pm$ 933,2	2020,6 $\pm$ 376,0	0,96	117,9 $\pm$ 0,0	874,3 $\pm$ 278,8	0,21	629,7 $\pm$ 0,0	727,8 $\pm$ 108,4	1,00	1370,8 $\pm$ 0,0	734,8 $\pm$ 114,2	0,40
TGF-β1	727,8 $\pm$ 86,1	1262,0 $\pm$ 99,2	0,11	760,0 $\pm$ 0,0	985,7 $\pm$ 256,8	1,00	246,0 $\pm$ 0,0	530,7 $\pm$ 152,5	0,89	879,3 $\pm$ 365,2	461,3 $\pm$ 97,8	0,21
HIF-1α	309,6 $\pm$ 56,0	340,2 $\pm$ 14,5	0,53	155,3 $\pm$ 0,0	364,6 $\pm$ 82,2	0,25	280,1 $\pm$ 0,0	355,2 $\pm$ 63,5	0,40	334,0 $\pm$ 41,2	278,2 $\pm$ 16,5	0,22
VEGF	234,5 $\pm$ 120,0	293,4 $\pm$ 48,2	0,82	146,0 $\pm$ 0,0	216,0 $\pm$ 49,8	1,00	653,0 $\pm$ 0,0	160,9 $\pm$ 67,1	0,22	227,2 $\pm$ 90,4	194,7 $\pm$ 32,9	0,66

RP+: casos positivos para retinopatia proliferativa. RP-: casos negativos para retinopatia proliferativa. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Teste estatístico: Mann-Whitney. Nível de significância estatística: $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O objetivo geral desta investigação foi verificar o comportamento de proteínas envolvidas nas vias de inflamação, hipóxia e angiogênese na DF e em seus diferentes genótipos, com o intuito de inferir possíveis variações nesses processos em decorrência das formas de herança da doença. Com os resultados obtidos, foi possível responder ao objetivo proposto e confirmar a hipótese de que tais processos comportam-se de maneiras e intensidades diferentes entre os portadores da doença, sendo, possivelmente, o genótipo e a gravidade hemolítica a ele associada, os principais modulares desses processos.

Como meios para atingir os objetivos propostos, além da avaliação do comportamento de citocinas pró-inflamatórias e fatores responsivos à hipóxia nos genótipos Hb SS, Hb SD, Hb S β -tal e Hb SC da DF, também foram analisados o *status* hemolítico dos grupos, polimorfismos genéticos como possíveis interferentes nos processos investigados e manifestações clínicas prevalentes em determinados genótipos. Todos esses resultados são discutidos pontualmente a seguir.

5.1 PERFIL HEMOLÍTICO DOS GENÓTIPOS DA DF

A análise da gravidade hemolítica nos genótipos da DF foi incluída no estudo para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos para os marcadores de inflamação, hipóxia e angiogênese quantificados. A escolha dos parâmetros hemolíticos considerados foi baseada na investigação de Nouraie et al. (2013), que validou o uso de quatro marcadores primordiais para avaliação de hemólise: porcentagem de reticulócitos e valores de LDH, AST e bilirrubina indireta. Todos os marcadores estiveram aumentados na DF, em nosso estudo.

A LDH se destacou, especialmente, nos genótipos Hb SS e Hb SD. A LDH é uma enzima da via glicolítica que catalisa a conversão de piruvato a lactato e está presente em todos os tecidos. Ela ocorre em cinco isoformas, das quais as isoformas LDH1 e LDH2 são mais abundantes nos eritrócitos (BALLAS, 2013) e representam pelo menos 70% da LDH total em condições de hemólise (KATO et al., 2006; KATO; NOURAIE; GLADWIN, 2013). Estudos mostram que a LDH total apresenta forte correlação com a quantidade de hemoglobina livre, que é um marcador de hemólise intravascular bem aceito na literatura, tornando-a, também, um importante indicativo de hemólise intravascular (KATO et al.,

2006; NOURAIE et al., 2013). Além de ser o principal indicativo indireto de hemólise, a LDH está relacionada com importantes complicações clínicas da DF, como hipertensão pulmonar, priapismo e úlcera de membros inferiores, sendo, portanto, também considerada um indicador bem estabelecido de gravidade na doença (KATO et al., 2006; NOURAIE et al., 2013; MIKOBİ et al. 2015). Os níveis elevados de LDH nos genótipos Hb SS e Hb SD indicam que os indivíduos desses grupos possuem similaridades na intensidade hemolítica, sendo mais graves do que os genótipos Hb S β -tal e Hb SC, que apresentaram menores valores de LDH.

A porcentagem de reticulócitos também se mostrou mais elevada no genótipo Hb SS, seguido por Hb SD e Hb S β -tal e, por fim, Hb SC. Os reticulócitos são eritrócitos jovens, produzidos na medula óssea, que perdem o núcleo e são lançados na circulação, onde completam sua maturação em um ou dois dias. A maturação envolve o remodelamento da membrana plasmática, mudanças no volume celular e eliminação de ribossomos e organelas. Os reticulócitos são células maiores, menos densas e deformáveis, e com propriedades adesivas elevadas, em relação aos eritrócitos maduros (PIVA et al., 2015). Devido a sua vida curta na circulação, em comparação com eritrócitos maduros normais, os parâmetros de reticulócitos são importantes ferramentas para avaliar a atividade da medula e caracterizar anemias hemolíticas (VELASCO-RODRÍGUEZ et al., 2015). Considerando que a porcentagem de reticulócitos é um dos índices indicativos de hemólise na DF, conforme validado por Nouraie et al. (2013), os valores elevados de reticulócitos, encontrados no presente estudo, evidenciam a anemia hemolítica em todos os grupos da DF, principalmente nos genótipos Hb SS e Hb SD, assim como os achados para a dosagem da LDH, anteriormente citados.

Os valores médios de AST, por sua vez, estiveram mais elevados no genótipo Hb SD, seguido pelo genótipo Hb SS. A AST é uma enzima abundante nos eritrócitos e participa da geração de glutamato e aspartato, que são aminoácidos essenciais às células vermelhas. A glutathione (GSH), por exemplo, é um peptídeo importante no reparo e prevenção de danos oxidativos aos eritrócitos, e é formada por aminoácidos como glutamato, cisteína e glicina. Como as membranas eritrocitárias são impermeáveis ao glutamato, a biossíntese intracelular desse aminoácido é mantida devido à atuação de enzimas como a AST (ELLINGER; LEWIS; MARKLEY, 2011). Níveis elevados de AST na DF são bem documentados, uma vez que a lise de células vermelhas libera grandes quantidades de AST na circulação, e mostram-se fortemente relacionados aos demais

marcadores hemolíticos, sendo considerados importantes indicativos de hemólise na doença (KATO, 2006; NOURAIE et al., 2013). Os resultados encontrados na dosagem de AST acompanham os demais marcadores hemolíticos avaliados, evidenciando semelhanças entre os genótipos Hb SS e Hb SD, e sugerindo gravidade maior para esses grupos em relação aos outros genótipos.

Por fim, a bilirrubina indireta também se apresentou elevada em todos os genótipos da DF, seguindo a ordem $SS > SD > S\beta\text{-tal} > SC$. A bilirrubina é o produto final do catabolismo do heme, um processo controlado pela enzima heme-oxigenase. Apresenta-se potencialmente tóxica, mas normalmente é neutralizada por ligação à albumina ou conjugação e excreção rápida pelo fígado. Cerca de 96% da bilirrubina presente no plasma corresponde à bilirrubina indireta, o que explica os níveis elevados de bilirrubina total encontrados em condições de hemólise (WANG; CHOWDHURY; CHOWDHURY, 2006; KAPLAN; BROMIKER; HAMMERMAN, 2014). Associada às dosagens de LDH e AST e à porcentagem de reticulócitos, a quantificação de bilirrubina, indireta ou total, é utilizada como marcador hemolítico na DF (KATO et al., 2006; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; NOURAIE et al., 2013). Estudos mostram que parâmetros hemolíticos podem variar com a idade e o sexo (NOURAIE et al., 2013), porém, em nosso estudo, a relação do sexo com a hemólise foi fraca, e a idade não apresentou relação.

Nossos resultados para esses marcadores refletem o grau hemolítico elevado da DF, sobretudo nos genótipos Hb SS e Hb SD. Em um panorama geral, é possível observar similaridades no perfil hematológico entre os grupos Hb SS e Hb SD, e entre Hb S β -tal e Hb SC. No primeiro caso, para todos os parâmetros avaliados, o perfil apresentado sugere maior gravidade, enquanto para Hb S β -tal e, principalmente Hb SC, as alterações foram menos acentuadas.

Os genótipos da DF apresentam gravidade clínica e hemolítica variável (KATO; GLADWIN; STEINBERG; BALLAS, 2015), assim como observado no nosso estudo. Ademais, essa gravidade pode ser variável entre indivíduos de um mesmo genótipo, devido aos fatores genéticos associados e adesão diferencial ao tratamento. De modo geral, indivíduos homozigotos para a Hb S são mais graves do que portadores dos outros genótipos (STEINBERG, 2009), no entanto, os resultados obtidos nessa análise de índices hemolíticos sugerem que indivíduos com dupla heterozigose SD podem apresentar quadro de hemólise tão grave quanto o grupo Hb SS.

Possivelmente, a gravidade clínica observada no grupo Hb SD se deva ao fato de a Hb D favorecer a polimerização da Hb S dentro dos eritrócitos (ADACHI et al., 1988). Acredita-se que a troca de aminoácidos na posição $\beta 121$ Glu→Gln, que caracteriza a Hb D, favoreça a interação de moléculas de Hb S e, consequentemente, a sua polimerização (CHARACHE; CONLEY, 1964; BENESCH et al., 1977). Adachi et al. (1988) mostraram que a velocidade de polimerização da Hb S é maior quando associada à Hb D e, assim, a possibilidade de falcização dos eritrócitos é maior e ocorre em menor tempo, durante a passagem dessas células pelos capilares (ADACHI et al., 1988).

Sendo assim, com base nos parâmetros avaliados, consideramos a seguinte escala decrescente de gravidade hemolítica para os grupos com DF: Hb SS, seguida dos genótipos Hb SD, Hb S β -tal e Hb SC.

A observação de que a interação Hb SD pode resultar complicações similares à anemia falciforme chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa para as propriedades da Hb D. Diante disso e da pouca informação na literatura sobre o assunto, foi redigido um artigo de revisão sobre essa hemoglobina, intitulado “*Hemoglobin D-Punjab: Origin, distribution and laboratory diagnosis*”, publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ISSN: 1516-8484) (APÊNDICE D).

5.2 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α E VEGF

Os níveis plasmáticos elevados de citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-8, TNF- α e TGF- β 1 nos grupos com DF, em relação ao grupo controle, revelam a condição inflamatória da doença. É consenso na literatura que a DF se desenvolve com estado inflamatório crônico, caracterizado pela elevação na quantidade de leucócitos e ativação anormal de granulócitos, monócitos e plaquetas, com relevante papel nos eventos fisiopatológicos da doença (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; HEBBEL, 2014; HOPPE, 2014). A gravidade clínica, por sua vez, também está relacionada à quantidade de glóbulos brancos circulantes, o que reforça o papel dos leucócitos na inflamação e na fisiopatologia da DF. Essa leucocitose geralmente é acompanhada por aumento nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, que exacerbam a falcização e a gravidade vaso-oclusiva da doença (HOPPE, 2014).

Mediadores pró-inflamatórios derivados de leucócitos, plaquetas e células endoteliais, como o TNF- α e as interleucinas IL-1 β , IL-8 e IL-6, já foram observados em níveis elevados na anemia falciforme (LANARO et al., 2009; QARI et al., 2012; SARRAY et al., 2015). O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias pode implicar em processos vaso-oclusivos, tais como ativação endotelial, adesão de eritrócitos e leucócitos ao endotélio vascular e apoptose de células endoteliais (CONRAN et al., 2009; LANARO et al., 2009). Ainda, a hemólise e o ferro heme liberado durante o processo promovem a ativação de inflamassomas, que são complexos proteicos envolvidos na ativação de caspases. A caspase-1, por exemplo, é responsável pela clivagem de precursores inativos de IL-1 β , com consequente ativação dessa interleucina (GROSS et al., 2011; DUTRA et al., 2014).

Em condições inflamatórias crônicas, como a DF, juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, também ocorre o aumento de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e TGF- β 1 (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETI; SOENHLEIN, 2013). Neste estudo, os níveis plasmáticos de TGF- β 1 foram elevados nos grupos com DF, em comparação aos controles sem hemoglobinopatias. Embora tenha sido inicialmente identificado como uma citocina pró-inflamatória, devido a sua atividade quimioatrativa de neutrófilos e macrófagos, o papel anti-inflamatório do TGF- β 1 vem ganhando maior destaque (HAN et al., 2012). Em resposta aos danos teciduais causados pela inflamação, o TGF- β 1 parece ser liberado por plaquetas e, também, por células endoteliais e fibroblastos, mantendo a homeostase e prevenindo a proliferação excessiva de células de defesa, contribuindo, assim, para a resolução da inflamação (AKHURST; HATA, 2012).

Os níveis plasmáticos de ANXA1 foram cerca de três vezes menores nos indivíduos com DF em relação ao grupo controle. Devido à ação biológica anti-inflamatória da ANXA1, baixos níveis desse peptídeo podem explicar a exacerbação da resposta inflamatória em algumas doenças e condições de inflamação aguda e crônica. Sena et al. (2013) demonstraram que a expressão de ANXA1 está diminuída em doenças inflamatórias intestinais, especificamente na Doença de Crohn, resultando em um desequilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios e sustentando a inflamação crônica na doença. Tsai et al. (2013) também quantificaram os níveis plasmáticos de proteínas pró e anti-inflamatórias em pacientes com sepse e verificaram baixos níveis de ANXA1 e altas quantidades de marcadores pró-inflamatórios.

Na DF, esse é o primeiro estudo para avaliar a proteína ANXA1, e os resultados obtidos são concordantes com a literatura existente para outras condições inflamatórias, como visto nos estudos de Sena et al (2013) e Tsai et al (2013), descritos acima. Níveis plasmáticos de ANXA1 reduzidos, associados com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, mostram o desequilíbrio existente entre a resposta inflamatória e a sua resolução em doenças com característica inflamatória, como a DF. No grupo controle, no qual os níveis de ANXA1 foram maiores, o controle da inflamação foi mais efetivo, como evidenciado pelos menores níveis de marcadores pró-inflamatórios.

Os nossos resultados obtidos nas dosagens dos mediadores pró e anti-inflamatórios reforçam a característica inflamatória da DF. Acompanhando esses dados, os níveis plasmáticos de HIF-1 α também foram superiores nos portadores da doença. Acredita-se que o estado inflamatório constante da DF contribui para a hipóxia e isquemia tecidual, implicando na ativação de HIF-1 α (KAUL et al., 2013). Embora a isquemia tecidual seja o principal estímulo para a ativação de HIF, algumas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , podem potencialmente induzir a expressão de HIF-1 α (KAUL et al., 2013).

Como consequência da ativação de HIF-1 α , é esperado que ocorra elevação nos níveis de VEGF, o principal fator responsivo à hipóxia, devido à estimulação de sua transcrição gênica pelo HIF-1 α (ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014). No entanto, não observamos relação estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de VEGF entre os grupos controle e com DF, embora os valores médios brutos tenham sido, aparentemente, superiores nesse último.

Sabe-se que o *splicing alternativo* é um mecanismo chave na regulação do VEGF, levando à produção de diferentes isoformas de proteína, com atuações distintas no organismo. Existem tanto formas pró-angiogênicas, como anti-angiogênicas, sendo que essas últimas podem explicar mais da metade do VEGF total encontrado em condições normais. A presença dos dois tipos de isoformas reflete a complexidade da via e sugere que a angiogênese é resultado do equilíbrio entre as atividades das isoformas (DEHGHANIAN; HOJATI; KAY, 2014).

Condições patológicas são caracterizadas pelo desequilíbrio entre as atividades dessas variedades de VEGF (DEHGHANIAN; HOJATI; KAY, 2014). Possivelmente, a ausência de diferenças nos níveis plasmáticos de VEGF, entre os grupos controle e com DF, se deva à realização da quantificação total de VEGF, sem distinção entre as isoformas. Em outras palavras, a proporção de isoformas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas pode

ser diferente entre os grupos, mesmo que os níveis médios totais de VEGF não apresentem variação.

As comparações entre os genótipos da DF mostram que indivíduos com Hb SS apresentam valores médios maiores para as quantificações plasmáticas das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-8, TNF- α e TGF- β 1. Para o TGF- β 1, valores mais elevados foram encontrados, também, para o grupo com Hb SD. Essas observações condizem com os resultados encontrados nas avaliações para os parâmetros hemolíticos, os quais foram mais elevados no genótipo Hb SS, seguido pelo grupo com Hb SD. A existência de variação fenotípica entre os diferentes genótipos da doença é conhecida, sendo a anemia falciforme a condição de maior gravidade, acompanhada pela maior intensidade na inflamação e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, em comparação aos demais genótipos, especialmente o genótipo Hb SC (STEINBERG, 2008; STEINBERG, 2009; SERJEANT, 2013).

Em relação à ANXA1, embora os níveis médios plasmáticos tenham sido menores em indivíduos com DF em relação ao controle sem hemoglobinopatias, os portadores do genótipo Hb SS apresentaram valores três vezes superiores aos encontrados nos demais genótipos da doença. Como mencionado anteriormente, a ANXA1 é abundante principalmente em neutrófilos, os quais podem externalizar grandes quantidades (50% a 70%) dessa proteína no plasma, especialmente em resposta às citocinas liberadas durante os processos inflamatórios e durante o extravasamento de neutrófilos (PERRETI, 1997; PERRETI; FLOWER, 2004; OLIANI et al., 2001). É possível que nos pacientes com Hb SS, condição inflamatória mais grave da DF, maior quantidade de ANXA1 seja externalizada, em comparação aos genótipos menos graves, mesmo que os níveis atingidos ainda sejam menores do que os encontrados em indivíduos sem a doença. Esse poderia ser um mecanismo compensatório de externalização, na tentativa de resolução do quadro inflamatório, que é mais grave nesse grupo. Ainda, como um dos principais mecanismos que desencadeia a externalização da ANXA1 é o contato entre neutrófilos e células endoteliais, acreditamos que os processos vaso-oclusivos ocorrendo em maior escala no genótipo Hb SS sejam potenciais estimuladores para a externalização e secreção de ANXA1 e possam explicar os maiores níveis plasmáticos da proteína encontrados para esse genótipo.

Comparando os valores de leucócitos totais, neutrófilos e plaquetas entre os genótipos da DF, verificamos que o comportamento desses parâmetros é semelhante ao

encontrado para as citocinas inflamatórias. Os neutrófilos representam as células imunes mais abundantes na circulação e podem estar envolvidos na promoção de doenças inflamatórias. Na DF, a quantidade de neutrófilos circulantes está positivamente relacionada à gravidade de manifestações clínicas apresentada pelos pacientes, tornando a contagem de leucócitos, mais especificamente de neutrófilos, um importante fator de risco para a DF (ZHANG et al., 2016). Em nosso estudo, a leucocitose esteve presente nos indivíduos com DF e a quantificação de neutrófilos foi elevada, sobretudo, nos genótipos Hb SS e Hb SD, os quais apresentaram maior intensidade hemolítica e maiores níveis de marcadores inflamatórios.

As plaquetas, que também estiveram elevadas na DF, principalmente no genótipo Hb SS, apesar de serem essenciais à homeostase, podem promover a inflamação. Na DF, plaquetas circulam em estado ativado, com agregação anormal e propriedades adesivas aumentadas, devido à expressão de moléculas de adesão (ZHANG et al., 2016). Além disso, as plaquetas também produzem quantidades relevantes de citocinas inflamatórias, como o TGF- β 1. O TGF- β 1 é um componente normal dos grânulos alfa de plaquetas e a maior parte da citocina circulante é proveniente da degranulação dessas plaquetas (MEYER et al., 2012; REDONDO; NAVARRO-DORADO; RAMAJO, 2012). Tendo em vista essa relação entre a inflamação, a ativação plaquetária e os níveis de TGF- β 1, o artigo científico intitulado “*Plasma levels of TGF- β 1 in homeostasis of the inflammation in sickle cell disease*” foi redigido e publicado na *Cytokine* (ISSN: 1043-4666) (APÊNDICE E).

5.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE

Embora a escolha de todos os polimorfismos rastreados tenha sido baseada em relatos na literatura sobre a relação desses na regulação gênica e, consequentemente, na expressão das proteínas, não encontramos, em nossos resultados, influência da maioria dos polimorfismos investigados nos grupos de estudo. Sabe-se que a via inflamatória é complexa e a maioria das citocinas apresenta atividade pleiotrópica, de modo que inúmeros fatores podem estar envolvidos no estímulo ou inibição da produção das diferentes citocinas. Possivelmente, em virtude dessa complexidade, não pudemos relacionar a herança de apenas um polimorfismo dos genes avaliados aos valores circulantes das proteínas por eles codificadas.

Ademais, a complexidade das vias envolvidas na fisiopatologia da DF e na modulação de sua expressão fenotípica pode exercer influência nas quantificações realizadas e, dessa forma, mascarar o papel de polimorfismos genéticos nos valores de marcadores estudados isoladamente. Estudos de expressão gênica, por exemplo, mostraram que eritrócitos contendo Hb S, por si só, são capazes de promover a super-regulação endotelial de TNF- α e IL-1, por mecanismos diretos ou indiretos ainda não completamente elucidados (BROWN; WICK; ECKMAN, 2001; HOPPE, 2014). Estudos também demonstram a expressão diferencial de mais de 100 genes envolvidos na inflamação, metabolismo do heme, regulação do ciclo celular, resposta antioxidante e angiogênese em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com DF (JISON et al., 2004).

Para o VEGF, no entanto, encontramos uma relação não esperada entre o polimorfismo e os níveis plasmáticos da proteína. De acordo com a literatura, a presença do alelo mutante A, do SNP -2578C/A, confere menores níveis de VEGF do que o alelo selvagem C. De fato, nossos resultados mostraram essa diminuição para o genótipo AA, porém, a herança do alelo A em heterozigose conferiu níveis bastante elevados de VEGF no grupo com Hb SS.

Chen, Dawes e Matthey (2012), analisando o polimorfismo -2578C/A em indivíduos de origem caucasóide com artrite reumatoide, observaram níveis séricos de VEGF reduzidos em portadores do genótipo AA, em relação aos genótipos CC e CA. No entanto, os níveis encontrados para CC e CA não diferiram entre si. Em nosso conhecimento, não há relatos na literatura sobre o efeito da sobredominância desse SNP nos valores de VEGF, como encontrado em nosso estudo. É importante lembrar que, além do efeito já conhecido do SNP no aumento da transcrição gênica do *VEGF*, existe a influência da própria DF, cuja fisiopatologia é extensamente complexa e pode exercer efeito de interferência nos valores de VEGF, superior aos efeitos causados pelo polimorfismo avaliado.

Nas análises combinadas dos polimorfismos genéticos e da DF e seus genótipos, verificamos que a doença foi a condição responsável pela variação nos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias e do marcador de hipóxia, acompanhando as análises isoladas. Em contrapartida os valores de VEGF não mostraram sofrer influência da doença, mas, sim, dos polimorfismos herdados, conforme observado nos tópicos anteriores. O HIF-1 α não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa, mostrando que seus níveis elevados na DF, conforme observado no tópico 4.3, não foram consideráveis na análise conjunta com o efeito de seu SNP 1772C/T.

O polimorfismo 1790G/A (*HIF1A*) só esteve presente em um dos 320 indivíduos avaliados neste estudo, perfazendo uma frequência de apenas 0,31% em heterozigose. A baixa frequência desse SNP nas amostras avaliadas impossibilitou qualquer análise estatística ou inferência sobre o seu efeito nos níveis plasmáticos de HIF-1 α .

O rastreamento desse polimorfismo nos grupos de estudo foi uma escolha baseada em relatos da literatura sobre o seu efeito na ativação da transcrição gênica do *HIF1A*, sendo um potencial indutor de níveis plasmáticos elevados da proteína (TANIMOTO et al. 2003; BAHADORI et al. 2010; KNECHTEL et al. 2010). Alguns estudos encontraram frequência superior a 3,5% para os genótipos GA/AA em populações austríacas (KNECHTEL et al. 2010), enquanto outros encontraram frequências baixas, como no presente estudo, em torno de 1,0%, em populações turcas e latinas (KONAC et al., 2009; FERNANDÈZ-TORRES et al., 2015). Não foram encontrados relatos na literatura sobre a frequência do polimorfismo 1790G/A (*HIF1A*) na população brasileira ou em populações com DF. Assim, este foi o primeiro levantamento realizado mostrando que a frequência desse polimorfismo é baixa nessas populações.

5.4 RELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE

Pelas análises de regressão linear, observamos, primeiramente, que o TNF- α influenciou nos valores de IL-8, HIF-1 α e VEGF. O TNF- α corresponde à primeira citocina a ser liberada na circulação durante a inicialização da resposta inflamatória, agindo na estimulação de outros mediadores mais tardios (MONACO et al., 2015). Os efeitos pró-inflamatórios do TNF- α são mediados pela ativação de NF-kB, que regula proteínas como IL-6, IL-8 e quimiocinas, além de retroalimentar a produção e liberação de TNF- α (AGGARWAL; GUPTA; KIM, 2012). Esse efeito do NF-kB sobre a IL-8 pode explicar a dependência encontrada para a IL-8 e o TNF- α observada neste estudo.

O ambiente de hipóxia criado pela condição inflamatória culmina no estímulo de HIF-1 α , sendo o TNF- α um potencial indutor desse fator de transcrição em macrófagos. Além dos mecanismos pós-traducionais de regulação do HIF-1 α já conhecidos, que envolvem a estabilização da subunidade alfa em condições hipóxia, existem, também, mecanismos regulatórios transcricionais independentes do oxigênio. Esses, são regulados pela ativação da transcrição gênica do *HIF1A* por meio do NF-kB, o qual desempenha seu

papel em decorrência da ativação pelo TNF- α (PALAZON et al., 2014). Assim, a inflamação e a hipóxia são eventos intimamente relacionados, condizendo com a dependência encontrada neste estudo para os marcadores TNF- α e HIF-1 α . A condição inflamatória também pode induzir a expressão de VEGF, devido à ação de citocinas inflamatórias, sendo o TNF- α a principal delas (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; BAO et al., 2009; DEHGHANIAN; HOJATI; KAY, 2014), conforme observado em nossos resultados.

Também pudemos verificar que a IL-1 β exerceu influência nos valores de IL-8, TGF- β 1 e VEGF. Embora ocorra em quantidades relativamente baixas na circulação, a IL-1 β é uma das citocinas mais importantes na cascata inflamatória, juntamente com o TNF- α . Ambos participam da resposta inflamatória inicial, desencadeando a expressão e ativação de mediadores secundários, com ação pró ou anti-inflamatória, como é o caso da IL-8 e do TGF- β (DINARELLO, 2011; LEAL et al., 2013; PALOMO et al., 2015), e, também, influenciando em fatores angiogênicos, como o VEGF (COSTA; INCIO; SOARES, 2007; DINARELLO, 2011).

Embora o TNF- α e a IL-1 β atuem juntos nas etapas iniciais da inflamação, não encontramos relação direta entre eles em nosso grupo. Muitos estudos mostram que a produção periférica de IL-1 β leva ao aumento de TNF- α , e vice-versa, porém, em algumas outras condições e/ou tecidos, essa relação pode não ocorrer (LEAL et al., 2013). Observamos, aqui, que os níveis de ambas as citocinas estiveram elevados na DF e, a ausência de dependência entre elas, sugere a participação de outros gatilhos de ativação das vias, causados, possivelmente, por situações intrínsecas da doença.

Como mencionado, a IL-8 mostrou-se responsiva às citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , bem como indutora de TGF- β e VEGF. O papel quimiotático de neutrófilos, desempenhado pela IL-8, ocorre em resposta ao estímulo promovido por mediadores inflamatórios iniciais da cascata inflamatória. É bem documentado na literatura que sua expressão aumenta como consequência da ação do IL-1 β e do NF- κ B, estimulado pelo TNF- α , na transcrição do seu gene *IL8* (JUNDI; GREENE, 2015).

Em resposta à inflamação desencadeada pelas citocinas pró-inflamatórias, há a produção e liberação de TGF- β 1, especialmente por macrófagos ativados e plaquetas. O TGF- β 1 é uma citocina com propriedades pró, mas, principalmente, anti-inflamatórias. Seu aparecimento promove a homeostase da inflamação, devido à inibição da proliferação de células de defesa, ativação da apoptose de linfócitos B e diminuição da resposta efetora de

neutrófilos e macrófagos. Além disso, o TGF- β 1 é capaz de polarizar neutrófilos e macrófagos do seu estado pró-inflamatório, para o estado anti-inflamatório (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013; HEADLAND; NORLING, 2015).

Com base no exposto, acreditamos que a elevação dos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias, encontrados na DF, tenha sido o estímulo para os níveis elevados de TGF- β 1, especialmente no genótipo SS. Os resultados significantes obtidos nas regressões lineares corroboram a influência da IL-1 β e da IL-8 nesses valores. Apesar dos níveis plasmáticos de TGF- β 1 elevados na DF, somados ao seu efeito anti-inflamatório, o quadro inflamatório mostrou-se presente em todos os grupos avaliados. Possivelmente, em virtude dos estímulos pró-inflamatórios crônicos característicos da DF, os agentes anti-inflamatórios endógenos não são capazes de conter a propagação da inflamação nesses indivíduos.

A ANXA1, por sua vez, acompanhou os valores obtidos para o TGF- β 1 na DF. Poucos estudos até o momento investigaram a relação entre essas duas proteínas anti-inflamatórias. Neymeyer et al. (2015), analisando efeitos antifibróticos em fibroblastos renais de ratos, verificaram que a administração de TGF- β levou ao aumento da produção de ANXA1, sugerindo que a biossíntese e liberação de ANXA1 pode ser induzida pelo TGF- β . A relação encontrada em nosso estudo concorda com esses resultados, no entanto, os mecanismos pelos quais essa indução poderia ocorrer não foram esclarecidos.

A relação negativa encontrada entre os valores plasmáticos de ANXA1 e VEGF no genótipo Hb S β -tal é contrária aos resultados obtidos nos estudos de Côté et al. (2010) e Pin et al. (2012), que verificaram aumento da expressão de ANXA1 nas células endoteliais devido à ação do VEGF. Não há outros estudos na literatura investigando essa relação, mas é possível que esses resultados discordantes possam ser devido à progressão do processo inflamatório, decorrente dos baixos níveis de ANXA1, levando à ativação endotelial e consequente expressão de VEGF. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

O VEGF, por fim, respondeu positivamente a todas as citocinas pró-inflamatórias e ao HIF-1 α , mostrando relação existente entre inflamação, hipóxia e angiogênese. A relação encontrada entre os fatores de angiogênese e hipóxia era esperada, uma vez que o VEGF é o principal alvo transcricional do HIF-1 α . A inflamação crônica e a angiogênese são eventos que ocorrem juntos, e a hipóxia participa dos dois processos, seja como estímulo ou consequência (COSTA; INCIO; SOARES, 2007). A inflamação envolve a ativação

endotelial, devido à ação de citocinas e aos eventos de migração e extravasamento de células imunes. De fato, estudos já observaram relação entre a resposta imune e a vascularização. Em contrapartida, a angiogênese sustenta a inflamação, por prover oxigênio e nutrientes aos sítios inflamatórios (COSTA; INCIO; SOARES, 2007) e, no caso da DF, de maneira sistêmica. A produção de VEGF também pode ocorrer durante a resolução da inflamação, na qual mediadores reparadores dos danos gerados são secretados (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013).

Algumas das relações descritas foram observadas apenas no grupo com DF, o qual apresenta estímulo pró-inflamatório constante. No grupo controle, composto por indivíduos sem clínica ou quaisquer interferentes evidentes na via inflamatória, provavelmente, não houve estímulo suficiente para gerar todas as relações de causa e efeito mensuráveis.

5.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO, HIPÓXIA E ANGIOGÊNESE EM STA E RETINOPATIA PROLIFERATIVA

Analisando-se a ocorrência de STA e retinopatia nos diferentes genótipos da DF, foi observada uma frequência elevada de STA e retinopatia proliferativa em genótipos específicos da DF, sendo eles Hb SS e Hb SC, respectivamente. A análise de chances, no primeiro caso, mostrou um aumento de 2,7 vezes e, no segundo caso, 4,6 vezes.

A STA é iniciada por três grandes gatilhos ocasionados pela oclusão vascular, que incluem infecção pulmonar, embolia gordurosa na medula e sequestro intravascular de eritrócitos falcizados no pulmão, resultando em danos ao órgão (GLADWIN; VICHINSKY, 2008). É uma complicação clínica grave e sua incidência na DF é relatada como dependente do genótipo. Afeta principalmente crianças, embora sua maior gravidade se dê em adultos, e é bastante comum na homozigose para Hb S (BALLAS et al., 2012). A retinopatia proliferativa é uma complicação ocular ocasionada pela oclusão da microvasculatura periférica da retina, resultando em isquemia da retina com consequente neovascularização. Na DF, por razões ainda não completamente elucidadas, afeta principalmente portadores de Hb SC, enquanto complicações mais graves predominam em indivíduos com Hb SS (FADUGBAGBE et al., 2010).

Pacientes com Hb SS apresentam complicações sistêmicas e de maior gravidade, com múltiplos eventos vaso-oclusivos que resultam, geralmente, em danos a órgãos. Já os pacientes heterozigotos, cursam com menos complicações sistêmicas, porém, com maior chance de desenvolvimento de processos vaso-oclusivos em pequenos vasos como os da retina. Provavelmente, esse genótipo mais benigno é o responsável pela maior prevalência de retinopatia em pessoas com Hb SC. Um dos mecanismos postulados para explicar esses números é que o quadro hemolítico mais brando na doença SC preserve a circulação na retina, permitindo a ocorrência de lesões proliferativas, em pequena escala e em longoprazo. Em homozigotos, por outro lado, processos vaso-oclusivos ocorrem em maior extensão, causando danos de maior escala e, conseqüentemente, os danos proliferativos são mais raros (ELAGOUZ et al., 2010; SCOTT; LUTTY; GOLDBERG, 2013; MELO, 2014). Neste estudo foi observada maior ocorrência de STA, uma complicação sistêmica e grave, no genótipo homozigoto, cuja gravidade hemolítica foi mais elevada em relação aos demais grupos. Ao passo que, em indivíduos com Hb SC, que apresentaram hemólise menos intensa, a retinopatia proliferativa foi a manifestação fenotípica mais comum. Alguns fatores responsáveis pelo prognóstico desfavorável de retinopatia no genótipo Hb SC em comparação ao genótipo homozigoto já foram relatados na literatura, como menores valores de Hb F e maiores níveis de hemoglobina total, quantidade de células vermelhas e hematócrito (FOX et al., 1990; LEVEZIEL et al., 2011). Analisando tais fatores em nossos grupos de estudo, também encontramos essa mesma relação, com destaque para concentração média de Hb F, que foi cerca de sete vezes menor no genótipo Hb SC, em relação ao grupo Hb SS, e representa o principal parâmetro laboratorial envolvido com a retinopatia proliferativa (LEVEZIEL et al., 2011).

Quanto aos polimorfismos aqui avaliados, não foram observadas associações significantes com as complicações clínicas de STA e retinopatia proliferativa. Na literatura, também não foram encontrados estudos de associação com resultados significativos entre a herança desses polimorfismos e os referidos fenótipos. Vicari et al (2015), recentemente, analisaram o polimorfismo -511C/T (*IL1B*) em pessoas com anemia falciforme e buscaram relacionar a herança do mesmo com a ocorrência de complicações clínicas da doença, entre elas a STA e a retinopatia proliferativa. Não foram observadas associações significantes entre essas variáveis.

Em consulta ao banco de dados *ClinVar*¹, buscamos por relatos científicos sobre uma possível relação entre os polimorfismos avaliados e a significância clínica desses. Também não foi encontrada nenhuma associação descrita entre essas variantes genéticas e os fenótipos de STA e retinopatia proliferativa. Dessa forma, nossas observações apontam que os polimorfismos avaliados neste estudo não contribuem direta e significativamente para o desenvolvimento de STA e retinopatia proliferativa na DF.

Os níveis plasmáticos dos marcadores avaliados entre os casos positivos e negativos de STA e retinopatia proliferativa não variaram significativamente nos genótipos da DF. Embora seja descrito na literatura que a condição inflamatória está associada à ocorrência de STA e que os processos angiogênicos estão ligados ao desenvolvimento de retinopatia proliferativa, não encontramos essa relação no presente estudo.

Resultados concordantes também foram obtidos por Cruz et al. (2015), que compararam os níveis plasmáticos de IL-1 β , TNF- α e VEGF em indivíduos com DF entre casos de retinopatia proliferativa, retinopatia não-proliferativa e ausência de retinopatia, e não observaram nenhuma relação significativa. Por outro lado, Cavalcante et al. (2015), avaliando os níveis séricos de TNF- α entre pacientes com DF, com e sem histórico de STA, encontraram níveis mais elevados da citocina no grupo de indivíduos com STA, em relação a indivíduos que nunca apresentaram a manifestação. No entanto, consideramos que existe uma limitação na associação de tais marcadores com as complicações clínicas da DF, neste e em outros estudos. Considerando que as quantificações, na maioria dos casos, são realizadas em época posterior ao aparecimento das manifestações, acreditamos que os valores obtidos podem não refletir aqueles apresentados pelos indivíduos no momento do surgimento das complicações clínicas obtidas a partir dos prontuários médicos.

Com essas considerações, o aumento ou diminuição das citocinas inflamatórias e dos fatores responsivos a hipóxia avaliados no presente estudo, em função das manifestações clínicas de STA e retinopatia proliferativa, podem ter sido mascarados pelo tempo decorrido entre o momento de surgimento da complicação e a coleta das amostras para dosagem dos marcadores. Durante o levantamento das informações clínicas dos pacientes com DF, para a realização do último objetivo proposto no estudo, foi possível notar uma diversidade de eventos fenotípicos relatados nos prontuários de portadores do genótipo Hb SD. Os resultados encontrados foram apresentados no *Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme*, realizado em Vitória-ES, no ano de 2015, na forma oral, e originaram

¹ *ClinVar*: banco de dados online, de acesso livre, com relatos descritos e suportados cientificamente, sobre a relação entre variantes genéticas humanas e fenótipos. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> acesso em dezembro/2015.

um artigo científico (*Rapid Communication*) intitulado “*Phenotypic diversity of the sickle cell disease in double heterozygous SD-Los Angeles*”, submetido ao *Hematology* (ISSN: 1024-5332) (APÊNDICE F).

Com o disposto, o estudo reuniu importantes achados sobre o comportamento de marcadores relacionados às vias de inflamação, hipóxia e angiogênese em diferentes formas de herança genética da DF. Em nosso conhecimento, essa investigação corresponde à primeira abordagem realizada considerando as três vias fisiopatológicas e os quatro genótipos da DF mais comuns na população brasileira. Ainda, esse é o primeiro estudo sobre os níveis plasmáticos de ANXA1 na DF. Os resultados aqui obtidos contribuem para o melhor entendimento da complexidade da DF e abrem novos caminhos para futuras explorações a cerca da sua fisiopatologia.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir:

1. Indivíduos com doença falciforme (DF) apresentam quadro hemolítico crônico, cuja intensidade é maior no genótipo Hb SS, seguido pelos genótipos Hb SD, Hb S β -tal e Hb SC, respectivamente. Portadores do genótipo Hb SD apresentam quadro hemolítico similar àquele encontrado para os homozigotos Hb SS.
2. Os polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*) e 1772C/T (*HIF1A*) estão presentes na população estudada, porém, a frequência do SNP 1790G/A (*HIF1A*) é muito baixa em relação aos achados da literatura para outras populações.
3. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-8 e TNF- α e a citocina anti-inflamatória TGF- β 1 estão elevadas na DF, em relação ao grupo controle, especialmente no genótipo Hb SS, revelando a condição inflamatória crônica da DF e maior gravidade inflamatória da forma homozigota. A proteína endógena ANXA1 está diminuída na DF, em comparação aos indivíduos sem hemoglobinopatias, evidenciando o desequilíbrio entre a resposta inflamatória e o processo de resolução, porém, em indivíduos com Hb SS, os níveis plasmáticos de ANXA1 são maiores em relação aos demais genótipos da DF. O fator induzido por hipóxia HIF-1 α está elevado na DF, indicando a hipóxia tecidual e sistêmica, sem distinção entre os genótipos que conferem a doença. Os níveis plasmáticos totais de VEGF não diferem entre pacientes com DF e indivíduos sem hemoglobinopatias.
4. Os polimorfismos -511C/T (*IL1B*), -251A/T (*IL8*), -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*) e 1772C/T (*HIF1A*) não interferem nos níveis plasmáticos das proteínas codificadas pelos respectivos genes. Por outro lado, a presença do genótipo AA para o polimorfismo -2578C/A (*VEGF*) confere níveis reduzidos de VEGF, enquanto o genótipo CA associa-se com níveis mais elevados do fator em portadores do genótipo Hb SS da DF, indicando efeito de sobredominância.

5. Na DF, inflamação, hipóxia e angiogênese são eventos intimamente relacionados. O TNF- α e a IL-1 β promovem produção e liberação de outras citocinas inflamatórias, como IL-8 e, conseqüentemente, TGF- β 1; enquanto o VEGF é estimulado tanto pelas citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-8, quanto pelo fator responsivo à hipóxia HIF-1 α . A liberação de ANXA1 responde positivamente aos níveis de TGF- β 1 e, negativamente, aos de VEGF.
6. Os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-8, TNF- α , ANXA1, TGF- β 1, HIF-1 α e VEGF, assim como os polimorfismos investigados nos seus respectivos genes, não estão relacionados à ocorrência de STA e retinopatia proliferativa na DF.

Associadas, essas conclusões mostram que a inflamação é uma condição presente em todos os genótipos da DF, com intensidade variável e dependente da gravidade da doença, sendo maior em indivíduos com Hb SS e Hb SD, e relacionada, também, aos processos de hipóxia e angiogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K. et al. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at β 121. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 12, p. 5607-5610, 1988.

ADEKILE, A.; MULLAH-ALI, A.; AKAR, N.A. Does elevated hemoglobin F modulate the phenotype in Hb SD-Los Angeles? **Acta Haematologica**, v. 123, p. 135-139, 2010.

AGGARWAL, B.B.; GUPTA, S.C.; KIM, H. Historical Perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 651-665, 2012.

AGGARWAL, B.B. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.

AKHURST, R.J.; HATA, A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. **Nature Review Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 790-811, 2012.

ARJAANS, M. et al. Transforming growth factor (TGF)- β expression and activation mechanisms as potential targets for anti-tumor therapy and tumor imaging. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 135, n. 2, p. 123-132, 2012.

ASHLEY-KOCH, A.E. et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5721-5726, 2008.

BAGGILIONI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Letters**, v. 307, n. 1, p. 97-101; 1992.

BAGGILIONI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676; p. 565-568; 1998.

BAHADORI, B. et al. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. **Vascular Medicine**, v. 15, p. 371-374, 2010.

BAIN, B.J. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. **Blood Review**, v. 25, p. 205-213, 2011.

BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 3, p. 338, 2012.

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

BALLAS, S.K. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 243-244, 2013.

BALLAS, S.K. Clinical Utility of Lactate Dehydrogenase in Determining the Severity of Hemolysis in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 144, n. 1, p. 173-174, 2015.

BAO, P. et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 153, p. 347-358, 2009.

BENESCH, R.E. et al. Location and bond type of intermolecular contacts in the polymerization of haemoglobin S. **Nature**, v. 269, n. 5631, p. 772-775, 1977.

BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**, São José do Rio Preto-SP: HN Editora, 2006.

BROWN, M.D.; WICK, T.M.; ECKMAN, J.R. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. **Pediatric Pathology and Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 47-72, 2001.

CAJADO, C.S. et al. IL-8 e TNF-alfa: marcadores imunológicos no prognóstico da anemia falciforme. **Gazeta Médica Da Bahia**, v. 80, p. 56-61, 2010.

CABOOT, J.B.; ALLEN, J.L. Hypoxemia in sickle cell disease: significance and management. **Paediatrics Respiratory Reviews**, v. 15, n. 1, p. 19-23, 2014.

CAJADO, C.S. et al. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, v. 56, p. 312-317, 2011.

CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 204-206, 2007.

CHARACHE, S.; CONLEY, C.L. Rate of sickle cells during deoxygenation of blood from persons with various sickling disorders. **Blood**, v. 24, p. 25-48, 1964.

CHEN, H. et al., Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 4, p. 519-529, 2006.

CHEN, Y.; DAWES, P.T.; MATTEY, D.L. Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: differential effect of cigarette smoking. **Cytokine**, v. 58, p. 390-397, 2012.

COLELLA, M.P. et al. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. **Haematologica**, v. 100, n. 4, p. 466-471, 2015.

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

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

CROIZAT, H.; NAGEL, R.L. Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 60, n. 2, p. 105-115, 1999.

CRUZ, P.R.S. et al. Increased circulating PEDF and low sICAM-1 are associated with sickle cell retinopathy. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 54, p. 33-37, 2015.

D'ACUNTO, C.W. et al. The complex understanding of Annexin 1 phosphorylation. **Cellular Signaling**, v. 26, p. 173-178, 2014.

DEHGHANIAN, F.; HOJATI, Z.; KAY, M. New insights into VEGF-A alternative splicing: key regulatory switching in the pathological process. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 192-199, 2014.

DINARELLO, C.A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 1203-1217, 2011.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 519-550, 2009.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 β . **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. S460-462, 2005.

DUTRA, F.F. et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **PNAS**, v. 111, n. 39, p. E4110-4118, 2014.

ELAGOUZ, M. et al. Sick cell disease and the eye: old and new concepts. **Survey of Ophthalmology**, v. 55, n. 4, p. 359-377, 2010.

ELAHI, M.M. et al. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 163-172, 2009.

ELLIOTT, L. et al., Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease, **British Journal of Haematology**, v. 137, n. 3, p. 262-267, 2007.

FACIO, F.N. et al. Annexin 1 mimetic peptide protects against against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Molecular Medicine (Berl)**, v. 89, n. 1, p. 51-63, 2011.

FADUGBAGBE, A. O. Ocular manifestations of sickle cell disease. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 30, p. 19-26, 2010.

FERNÁNDEZ-TORRES, J. et al. Polymorphic variation of hypoxia inducible factor-1A (HIF1A) gene might contribute to the development of knee osteoarthritis: a pilot study. **BioMed Central Musculoskeletal Disorders**, v. 16, p. 218, 2015.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, 2003.

FLOWER, R.J.; BLACKWELL, G.J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**, v. 278, n. 5703, p. 456-459, 1979.

FOX, P.D. et al. Risk factors for proliferative sickle retinopathy. **British Journal of Ophthalmology**, v. 74, n. 3, p. 172-176, 1990.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, p. 11, 2010.

GARLANDA, C. DINARELLO, C.A., MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003-1008, 2013.

GLADWIN, M.T.; VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p.2254-2265, 2008.

GRAINGER, D.J. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 1, 1999.

GREER, P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 13th ed. Philadelphia: lippincott williams & wilkins; 2014, p. 2763.

GRELL, M. et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, v. 83, n. 5, p. 793-802, 1995.

GROSS, O. et al. The inflammasome: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 243, n. 1, p. 136-151, 2011.

HAJEER, A.H.; HUTCHINSON, I.V. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF α production and disease. **Human Immunology**, v. 62, p. 1191-1199, 2001.

HAN, G. et al. The pro-inflammatory role of TGF- β 1: a paradox?. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 228-235, 2012.

HEADLAND, S.E; NORLING, L.V. The resolution of inflammation: Principles and Challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, p. 149-160; 2015.

HEBBEL, R.P. Ischemia-reperfusion injuri in sickle cell anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 181-198, 2014.

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. **Cardiovascular and Hematological Disorders-Drugs Targets**, v.9, n. 4, 271-292, 2009.

HIGGS, D.R. et al. Understanding α -globin gene regulation: aiming to improve the management of thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1054, p. 92-102, 2005.

HOPPE, C.C. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, v. 28, p. 265-286, 2014.

HULL, J., THOMSON, A., KWIATKOWSKI, D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. **Thorax**, v. 55, n. 12, p. 1023-1027, 2000.

IAMPIETRO, M.; GIOVANNETTI, T.; TARAZI, R. Hypoxia and inflammation in children with sickle cell disease: implications for hippocampal functioning and episodic memory. **Neuropsychology Review**, 2014.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante β -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.

JISON, M.L. et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. **Red Cells**, v. 104 , n. 1, p. 270-280, 2004.

JUNDI, K.; GREENE, C.M. Transcription of Interleukin-8: How altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1386-1398, 2015.

KAPLAN, M.; BROMIKER, R.; HAMMERMAN, C. Hyperbilirubinemia, hemolysis, and increased bilirubin neurotoxicity. **Seminars Inperinatology**. v. 38, p. 429-437, 2014.

KASSIM, A.A.; DEBAUN, M.R. Sickle cell disease, vasculopathy, and therapeutics. **The Annual Reviews of Medicine**, v. 64, p. 451-466, 2013.

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. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 2, p. 618-625, 2009.

KATO; G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37-47, 2007.

KATO, G.J.; NOURAIE, SM.; GLADWIN, M.T. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1091-1092, 2013.

KAUL D.K. et al. Antisickling fetal hemoglobin reduces hypoxia-inducible factor-1 α expression in normoxic sickle mice: microvascular implications. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, p. H42-H50, 2013.

KEIKHAEI, B.; MOHSENI, A.R.; NOROUZIRAD, R. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European Cytokine Network**, v. 24 n. 1, p. 45-52, 2013.

KNECHTEL, G. et al. Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 gene and the colorectal cancer risk. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, p. 805,809, 2010.

KONAC, E. et al. Genetic variations in the hypoxia-inducible factor-1 α gene and lung cancer. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 1109-1116, 2009.

KÖSELER, A. Allele frequency of VNTR locus D1S80 observed in Hb D-Los Angeles carriers. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 10747-10750, 2012.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 235-242, 2009.

LEAL, M.C. et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's disease?. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 53, 2013.

LEVEZIEL, N. et al. Clinical and laboratory factors associated with the severity of proliferative sickle cell retinopathy in patients with sickle cell hemoglobin C (SC) and homozygous sickle cell (SS) disease. **Medicine**, v. 90, n. 6, p. 372-378, 2011.

LIONNET, F. Hemoglobin SC disease complications: a clinical study of 179 cases. **Haematologica**, v. 97, n. 8, p. 1136-1141, 2012.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p.519-531, 2011.

MELO, M.B. An eye on sickle cell retinopathy. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 5, p. 319-321, 2014.

MEYER, A. et al. Platelet TGF- β 1 contributions to plasma TGF- β 1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload. **Blood**, v. 119, n. 4, p. 1064-1074, 2012.

MIKOBI, T.M. et al. Correlation between the lactate dehydrogenase levels with laboratory variables in the clinical severity of sickle cell anemia in Congoalese patients. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0123568, 2015.

MONACO, C. et al. Anti-TNF family: past, present and future. **International Immunology**, v. 27, n. 1, p. 55-62, 2015.

MUÑOZ-CHÁPULI, R. Evolution of angiogenesis. **The International Journal of Development Biology**, v. 55, p. 345-351, 2011.

MYLINH LA. et al. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2247-2256, 2001.

NAGEL, R.L.; FABRY, M.E.; STEINBERG, M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Review**, v. 17, p. 167-178, 2003.

NEYMEYER, H. et al. Activation of annexin A1 signalling in renal fibroblasts exerts antifibrotic effects. **Acta Physiologica**, v. 215, n. 3, p. 144-158, 2015.

NOURAIE, M. et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Haematologica**, v. 98, n. 3, p. 464-472, 2013.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**, v. 26, p. 157-165, 2005.

OLIANI, S.M. et al. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 2, p. 603-615, 2001.

OLIANI, S. M.; GIL, C. D. Proteína antiinflamatória anexina 1: mecanismos celulares e relevância clínica. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 4, 2006.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated review. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661-674, 2013.

ORTMANN, B.; DRUKER, J.; ROCHA, S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 3569-3582, 2014).

OWUSU-ANSAH, A. et al. Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. **Translational Research**, 2015.

PALAZON, A. et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. **Immunity**, v. 41, p. 518-528, 2014.

PAUL, R. N.; CASTRO, O. L.; AGGARWAL, A.; O'NEAL, P. A. Acute chest syndrome: sickle cell disease. **European Journal of Hematology**, v. 87, n. 3, p.191-207, 2011.

PATEL, D.K. Fetal hemoglobin and alpha thalassemia modulate the phenotypic expression of HbSD-Punjab. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 36, n. 4, p. 444-450, 2013.

PERRETI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 11, p. 418-425.

PERRETTI, M.; FLOWER; R.J. Annexin 1 and the biology of neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 1, p.25-29, 2004.

PIEL, F.B. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*, v. 381, n. 9861, p. 142-151, 2013.

PIVA, E. et al. Clinical utility of reticulocytes parameters. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 1, p. 133-163, 2015.

QARI, M.H.; DIER, U.; MOUSA, S.A. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 18, n. 2, p. 195-200, 2012.

QIN, C. et al. Cardioprotective potential of annexin-A1 mimetics in myocardial infarction. *Pharmacology and Therapeutics*, 2014.

RAHIMI, N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 3, p. 538-548, 2012.

REDONDO, S.; NAVARRO-DORADO, J.; RAMAJO, M. The complex regulation of TGF- β in cardiovascular disease. **Journal of Vascular Health and Risk Management**, v. 8, p. 533-539, 2012.

REES, D.C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. *Lancet*, v. 376, p. 2018-2031, 11 Dec 2010.

RIFKIND, J.M.; MOHANT, J.G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Frontiers in Physiology**, v. 14, n. 5, p. 500-507, 2015.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L. et al. TNFA -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 216, p. 125-130, 2011.

SAKAMOTO, T.M. et al. Increased levels and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. **Microvascular Research**, v. 90, p. 173-179, 2013.

SAMLI, H. et al. Vascular endothelial growth factor gene 1154G/A, 2578C/A, 460C/T, 936C/T polymorphisms association with recurrent pregnancy losses. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4739-4745, 2012.

SANKARAN, V.J.; ORKIN, S.H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.3, p. a011643, 2013.

SCHECHTER. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SARRAY, S. et al. Serum IL-6, IL-10 and TNF- α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. **Cytokine**, 72, p. 43-47, 2015.

SCOTT, A.W.; LUTTY, G.A.; GOLDBERG, M.F. **Hemoglobinopathies: retinal vascular diseases**. In: Ryan SJ, editor. Retina. Philadelphia: Elsevier; 2013, 1071–1082p.

SENA, A. et al. Dysregulation of anti-inflammatory annexin A1 expression in progressive Crohns disease. Plos one, v. 8, n. 10, p. 76969, 2013.

SERJEANT, G.R. The natural history of sickle cell disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 10, p. a011783, 2013.

SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 162, p. 3-14, 2013.

STEINBERG, M.H.; ADEWOYE, A.H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Current Opinion of Hematology**, v. 13, n. 3, p. 131-136, 2006.

STEINBERG, M.H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **The Scientific World Journal**, v. 9, p. 46-67, 2009.

STEINBERG, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.

STEINBERG, M.H. et al. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management**, New York: Cambridge University Press, 2001.

STRIZ, I. et al. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clinical Science**, v. 126, n. 9, p. 593-612, 2014.

SUN, K.; XIA, Y. New insights into sickle cell disease: a disease of hypoxia. **Current Opinion in Hematology**, v. 20, n. 3, p. 215-221, 2013.

TAIMEH, Z. et al. Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, p. 519-530, 2013.

TANIMOTO, K. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 1779-1783, 2003.

THEIN, S.L. The molecular basis of β -thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 5, p. a0011700, 2013.

TRIKHA, P.; CARSON, W. E. Signaling pathways involved in MDSC regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1846, n. 1, p. 55-65, 2014.

TSAI, W. et al. Plasma levels of sepsis patients of annexin A1, lipoxin A4, macrophage inflammatory protein-3a, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 76, n. 9, p. 486-490, 2013.

VELASCO-RODRÍGUEZ, D. et al. Reticulocyte parameters of delta beta thalassaemia trait, beta thalassaemia trait and iron deficiency anaemia. **Journal of Clinical Pathology**, 2015.

VICARI, P. et al. Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood cells, molecules and diseases**, v. 54, p. 244-249, 2015.

WANG, X.; CHOWDHURY J.R.; CHOWDHURY, N.R. Bilirubin metabolism: applied physiology. **Current Paediatrics**, v. 16, p. 70-74, 2006.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

ZHANG, H. et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. **Clinical Science**, v. 116, p. 219-230, 2009.

ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways, an the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, 2016.

ZEPEDA, A.B. et al. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, p. 451-459, 2013.

APÊNDICE A – Testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinopatias

- *Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)¹*

Esfregaço sanguíneo realizado em lâmina a partir de uma gota de sangue total. Após visualização em microscópio de luz, em objetiva de 40x, de acordo com a quantidade e intensidade de células microcíticas, hipocrômicas e com alterações de forma, as amostras foram classificadas segundo padronização do LHGDH:

- Ausência de alterações (N).
- Alterações discretas (+).
- Alterações moderadas (++)
- Alterações acentuadas (+++).

- *Avaliação da resistência dos eritrócitos à hemólise (BONINI-DOMINGOS, 2006)*

Reagentes:

Solução Estoque NaCl a 10% pH 7,4:

- NaCl 9,0 g.
- Na₂HPO₄ 1,36 g.
- NaH₂PO₄.H₂O 0,28 g.
- Água destilada q.s.p.100 mL.

Solução trabalho:

- NaCl 10% 36 mL.
- Água destilada q.s.p 1000 mL.

Procedimento: Em um tubo de ensaio, foram colocados 2,0 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, com posterior agitação por inversão. A leitura foi feita após 10 minutos.

Interpretação: O tubo de ensaio com a solução foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com listras negras. Amostras negativas para o teste permitiram a fácil visualização das listras, enquanto amostras positivas não permitiram essa visualização, já que a resistência aumentada à hemólise torna a amostra opaca.

1 BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. São José do Rio Preto: HN, 2006.

- *Análise do padrão de migração das hemoglobinas em eletroforese em pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965)¹*

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.

Corante Ponceau:

- Ponceau S 0,5 g.
- Ácido tricloroacético 5,0 g.
- Água destilada q.s.p 100 mL.

Solução descorante:

- Ácido acético glacial 100 mL.
- Metanol 50 mL.
- Água destilada q.s.p 1000 mL.

Procedimento: Após estarem submersas em tampão TEB, durante 15 minutos, as fitas de acetato de celulose foram secas, com auxílio de papel absorvente. Depois de secas, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese e os compartimentos eletrolíticos foram conectados com auxílio de papel filtro. O hemolisado de hemoglobinas foi aplicado nas fitas de acetato de celulose com distância de 1,0 cm da extremidade da fita que estava em contato com o polo negativo, recebendo 300 volts por 30 minutos.

Interpretação: Após corrida eletroforética, o padrão de migração foi observado. Em alguns casos, as fitas coram coradas com *Ponceau* para melhor visualização e/ou armazenamento. Para a coloração, as fitas foram submersas no corante durante 5 minutos e, posteriormente, embebidas em solução descorante por pelo menos 30 minutos.

1 MARENGO – ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. *Journal of Clinical Pathology*. v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

- *Análise do padrão de migração das hemoglobinas em eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)¹*

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

Procedimento: Misturou-se o ágar-fosfato ao tampão fosfato até a dissolução. A mistura foi levada ao microondas por 1 minuto, com intervalos para agitação. Pipetou-se 5,0 mL do gel em uma lâmina de microscópio, deixando-as gelificar em temperatura ambiente. As amostras foram, então, aplicadas na porção média da lâmina. Utilizou-se papel filtro para promover a conexão entre o gel e os compartimentos eletrolíticos, passando 100 volts durante 30 minutos.

Interpretação: Após corrida eletroforética, o padrão de migração foi observado. Em alguns casos, as lâminas foram coradas com *Ponceau*.

- *Quantificação das frações de hemoglobinas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1999)*

Procedimento: Foram misturados 5 µL de sangue total e 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Os hemolisados foram alojados no equipamento e os procedimentos foram realizados conforme pré-programação de leitura das amostras.

Interpretação: A quantificação das frações de hemoglobina foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparada aos valores de calibração específicos, fornecidos pelo fabricante, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Valores de Hb A₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,0%, previamente estabelecidos pelo fabricante.

1. VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.

APÊNDICE B – Análises moleculares para confirmação dos genótipos da DF

- *Extração do DNA (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989)¹*

Reagentes:*1. Solução de lise 1 (lise de células vermelhas) para extração de DNA*

- Sacarose 0,32 M 10,95g.
- Tris HCl 10 mM 1mL.
- MgCl₂ 5mM 0,5 mL.
- Triton 1% 100x 1 mL.
- Água ultrapura autoclavada 100 mL.

2. Solução de lise 2(lise de células brancas) para extração de DNA

- NaCl 0,075 M 2,19 g.
- EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0) 20 mL.
- Água ultrapura 500 mL.

3. Proteinase K (20 mg/mL):

- Proteinase K 20 mg.
- Água ultrapura 1 mL.

4. Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1:

- Clorofórmio..... 24 mL.
- Álcool isoamílico 1 mL.

5. SDS 10%:

- SDS 10 g.
- Água ultrapura 100 mL.

*6. Etanol 70%**7. Fenol*

1. SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

8. KCl 2M:

- KCl (peso molecular 74,55 g) 14,91 g.
- Água ultra pura autoclavada q.s.p. 100 mL.

Procedimento: Cerca de 500 a 800 uL de amostras de sangue periférico, colhidas em tubos contendo EDTA, foram colocados em tubos *ependorf* e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 rpm.

O sobrenadante foi descartado, deixando-se aproximadamente 300 uL de pellet no tubo, e a esse precipitado adicionou-se novamente solução de lise 1, até completar 1,0 mL. As amostras foram agitadas até dissolução do pellet e descansaram por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem centrifugadas novamente por 5 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento de lavagem foi realizado mais uma vez.

Ao pellet foram adicionados 450 µL de solução de lise 2, 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas em banho-maria a 37°C overnight ou a 42°C por 3 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 500 µL de fenol e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6500 rpm durante 5 minutos.

A fase superior foi transferida para outro tubo e foram adicionados 500 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por mais 5 minutos a 6500 rpm e o procedimento foi repetido por mais uma vez.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 50 µL de KCL gelado e 500 µL de etanol 100%, também gelado, foram adicionados. O tubo foi invertido várias vezes, até ocorrer a precipitação do DNA, e centrifugado por 30 segundos a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA, que ficou aderido ao tubo, com 200 µL de etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os tubos passaram cerca de 15 minutos secando.

O DNA foi re-hidratado com 50 µL de água ultra pura e ficou descansando overnight em temperatura ambiente, para total solubilização da amostra. As amostras foram estocadas a -20°C para posterior análise.

- *PCR-RFLP para identificação de Hb S e Hb C*

Para amplificação da região que envolve o sexto códon da globina beta, local onde estão as mutações para Hb S e Hb C, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

- *primer sense* P 277: 5' - GGCAGAGCCATCTATTGCTTA - 3'

- *primer antisense* P 278: 5' - ACCTTAGGGTTGCCCATAAC - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	14,3 µL.
Primer P 277 10 µM	1,5 µL.
Primer P 278 10 µM	1,5 µL.
dNTP 1,25 mM	1,0 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	3,0 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Ciclo de 35 repetições:
 - Desnaturação durante 30 segundos a 94°C.
 - Anelamento durante 30 segundos a 55°C.
 - Extensão de 1 minuto a 72°C.
- Extensão de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido por enzima de restrição específica, conforme segue:

Digestão para identificação da Hb S

H ₂ O Mili Q	9,0 µL.
Tampão Fast Digest	1,0µL.
Enzima Fast Digest <i>Dde</i> I (5'- C↓TNAG -3')	1,0 µL.

Produto da PCR 5,0 µL.

Digestão em banho maria por 5 minutos a 37°C.

Na presença do alelo normal A, a enzima de restrição age em três sítios, originando quatro fragmentos (201 pb, 88 pb, 87 pb e 6pb). A substituição pelo alelo mutante T elimina um dos sítios de restrição, sendo produzidos, então, apenas três fragmentos (288 pb, 88 pb e 6 pb). O fragmento de 6pb não é visível.

Digestão para identificação da Hb C

H₂O Mili Q 5,0 µL.

Enzima BseRI (5'- GAGGAG(N)_{10/8}↓ -3') 1,5 µL.

Tampão 1,0 µL.

Produto da PCR 3,0 µL.

Digestão em banho maria por 3 horas a 37°C.

Quando o alelo normal G está presente, o segmento amplificado apresenta um sítio de restrição para a enzima, o que gera dois fragmentos (278 pb e 104 pb). O alelo mutante A elimina esse sítio de reconhecimento e o fragmento de 382 pb mantém-se intacto. O produto da digestão com as enzimas de restrição para as duas reações de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos. A visualização do gel se deu sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

- *PCR-RFLP para identificação de Hb D*

Para amplificação da região onde se localiza a mutação para a Hb D, no códon 121 da globina beta, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores:

- *primer sense* CD1: 5' - TGCCTCTTTGCACCATCTA - 3'

- *primer antisense* CD2: 5' - GA CTCCCACATTCCCTTTT - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H₂O Mili Q 12,2 µL.

Tampão sem MgCl₂ 2,5 µL.

MgCl ₂ 50 mM	2,0 µL.
dNTP 5 mM	3,0 µL.
Primer CD1 10 µM	2,0 µL.
Primer CD2 10 µM	2,0 µL.
Taq Polimerase 5U	0,3 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial durante 5 minutos a 94°C.
- Ciclo de 35 repetições:
 - Desnaturação durante 30 segundos a 94°C.
 - Anelamento durante 30 segundos a 56°C.
 - Extensão de 1 minuto a 72°C.
- Extensão de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 564 pb foi digerido por enzima de restrição específica, conforme segue:

Enzima EcoRI (5'- G↓AATTC -3')	1,0 µL.
Tampão EcoRI 1x	5,0 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.
Digestão em banho maria por 3 horas a 37°C.	

Na presença do alelo normal G, a enzima EcoRI possui sítio de restrição na sequência amplificada, gerando, assim dois fragmentos (296 pb e 268 pb). Quando há a troca de G por C, o sítio é perdido e apenas um fragmento é observado (564 pb). A digestão da PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizada sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

- *PCR-AE para identificação de beta-talassemia (BERTHOLO; MORERIA, 2006)¹*

Para todas as reações, os seguintes oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados como controle interno das reações, amplificando um fragmento de 639pb:

1. BERTHOLO, L. C.; MOREIRA H. W. Focalização isoeletrica na identificação das hemoglobinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 42 n. 3, p. 163-168, 2006.

- *primer sensi* B5a: 5' - GGCTGTCATCACTTAGACCTCA 3'

- *primer antisensi* B5b: 5' - AGAAGGGGAAAGAAAACATCAA - 3'

Mutação CD39

Os *primers* específicos utilizados para amplificação dos alelos normais e/ou mutantes da mutação CD39 foram:

- *primer sensi* PS39W: 5' - GACTCAAAGAACCTCTG - 3'

- *primer antisensi* PS39M: 5' - GACTCAAAGAACCTCTA - 3'

Para cada amostra foram preparados dois tubos de reação, um para identificação do alelo mutante e outro para o alelo normal, com volume final de 25 µL:

Alelo Normal (W)	Alelo Mutante (M)
H ₂ O Mili Q 8,0 µL.	H ₂ O Mili Q 8,0 µL.
Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.	Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM 0,75 µL.	MgCl ₂ 50 mM 0,75 µL.
DMSO 100% 1,0 µl.	DMSO 100% 1,0 µl.
dNTP 5 mM 4,0 µL.	dNTP 5 mM 4,0 µL.
<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,5 µL.
<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,5 µL.
<i>Primer</i> PS39W 10 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> PS39M 10 µM 2,5 µL.
Taq Polimerase 5U 0,25 µL.	Taq Polimerase 5U 0,25 µL.
DNA 150 ng/µL 1,0 µL.	DNA 150 ng/µL 1,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial durante 7 minutos a 95°C.
- Ciclo de 32 repetições:
 - Desnaturação durante 50 segundos a 94°C.
 - Anelamento durante 50 segundos a 54°C.
 - Extensão de 50 segundos a 72°C.
- Extensão de 7 minutos a 72°C.

O tamanho da sequência amplificada para esta reação é de 439 pb. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos, e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

Mutação IVS-I-1

Os *primers* específicos utilizados para amplificação dos alelos normais e/ou mutantes da mutação IVS-I-1 foram:

- *primer sensi* IVSI1W: 5' - GTGACCTTGATACCAAC - 3'
- *primer antisensi* IVSI1M: 5' - GTGACCTTGATACCAAA - 3'

Para cada amostra foram preparados dois tubos de reação, um para identificação do alelo mutante e outro para o alelo normal, com volume final de 25 µL:

Alelo Normal (W)	Alelo Mutante (M)
H ₂ O Mili Q 8,0 µL.	H ₂ O Mili Q 8,0 µL.
Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.	Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM 0,75 µL.	MgCl ₂ 50 mM 0,75 µL.
DMSO 100% 1,0 µL.	DMSO 100% 1,0 µL.
dNTP 5 mM 4,0 µL.	dNTP 5 mM 4,0 µL.
<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> B5a 2 µM..... 2,5 µL.
<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,5 µL.
<i>Primer</i> IVSI1W 10 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> IVSI1M 10 µM 2,5 µL.
Taq Polimerase 5U 0,25 µL.	Taq Polimerase 5U 0,25 µL.
DNA 150 ng/µL 1,0 µL.	DNA 150 ng/µL 1,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial durante 7 minutos a 95°C.
- Ciclo de 32 repetições:
 - Desnaturação durante 50 segundos a 94°C.
 - Anelamento durante 50 segundos a 54°C.
 - Extensão de 1 minuto a 72°C.
- Extensão de 7 minutos a 72°C.

O produto gerado pelos primers específicos foi de 268 pb. A análise dos fragmentos foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos, e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

Mutação IVS-I-6

Os *primers* específicos utilizados para amplificação dos alelos normais e/ou mutantes da mutação IVS-I-6 foram:

- *primer sensi* IVSI6W: 5' - GTCTTGTAACCTTGATA - 3'
- *primer antisensi* IVSI6M: 5' - GTCTTGTAACCTTGATG - 3'

Para cada amostra foram preparados dois tubos de reação, um para identificação do alelo mutante e outro para o alelo normal, com volume final de 25 µL:

Alelo Normal (W)	Alelo Mutante (M)
H ₂ O Mili Q 7,85 µL.	H ₂ O Mili Q 7,85 µL.
Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.	Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM 0,75 µL.	MgCl ₂ 50 mM 0,75 µL.
DMSO 100% 1,0 µL.	DMSO 100% 1,0 µL.
dNTP 5 mM 4,0 µL.	dNTP 5 mM 4,0 µL.
<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,5 µL.
<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,5 µL.
<i>Primer</i> IVSI6W 10 µM 2,5 µL.	<i>Primer</i> IVSI6M 10 µM 2,5 µL.
Taq Polimerase 5U 0,4 µL.	Taq Polimerase 5U 0,4 µL.
DNA 150 ng/µL 1,0 µL.	DNA 150 ng/µL 1,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial durante 7 minutos a 95°C.
- Ciclo de 32 repetições:
 - Desnaturação durante 50 segundos a 94°C.
 - Anelamento durante 50 segundos a 54°C.
 - Extensão de 50 segundos a 72°C.
- Extensão de 7 minutos a 72°C.

O segmento amplificado foi de 273 pb. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos, e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

Mutação IVS-I-110

Os *primers* específicos utilizados para amplificação dos alelos normais e/ou mutantes da mutação IVS-I-110 foram:

- *primer sensi* TB110W: 5' - GGGTGGGAAAATAGACC - 3'
- *primer antisensi* TB110M: 5' - GGGTGGGAAAATAGACT - 3'

Para cada amostra foram preparados dois tubos de reação, um para identificação do alelo mutante e outro para o alelo normal, com volume final de 25 µL:

Alelo Normal (W)	Alelo Mutante (M)
H ₂ O Mili Q 9,0 µL.	H ₂ O Mili Q9,0 µL.
Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.	Tampão sem MgCl ₂ 2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM 1,5 µL.	MgCl ₂ 50 mM 1,5 µL.
DMSO 30% 1,0 µL.	DMSO 30% 1,0 µL.
dNTP 5 mM 3,5 µL.	dNTP 5 mM 3,5 µL.
<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,0 µL.	<i>Primer</i> B5a 2 µM 2,0 µL.
<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,0 µL.	<i>Primer</i> B5b 2 µM 2,0 µL.
<i>Primer</i> TB110W 10 µM 2,0 µL.	<i>Primer</i> TB110M 10 µM 2,0 µL.
Taq Polimerase 5U 0,4 µL.	Taq Polimerase 5U 0,4 µL.
DNA 150 ng/µL 1,0 µL.	DNA 150 ng/µL 1,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial durante 7 minutos a 95°C.
- Ciclo de 32 repetições:
 - Desnaturação durante 50 segundos a 94°C.
 - Anelamento durante 1 minuto a 58°C.
 - Extensão de 50 segundos a 72°C.
- Extensão de 7 minutos a 72°C.

Os primers específicos geraram um produto de 337 pb. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos, e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

APÊNDICE C - Rastreamento dos polimorfismos

- *PCR-RFLP para o polimorfismo -511C/T (IL1B)*

- *primer sense* IL1B1: 5' - AAGAGGCAAAGGAGGGTGTT - 3'

- *primer antisense* IL1B2: 5' - GCCCTCCCTGTCTGTATTGA - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	11,6 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	1,0 µL.
DMSO 100%	0,7 µL.
dNTP 5 mM	2,0 µL.
<i>Primer IL1B1</i> 10 µM	2,5 µL.
<i>Primer IL1B2</i> 10 µM	2,5 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições de ciclagem:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 35 repetições
 - Desnaturação 30 segundos a 95°C.
 - Anelamento durante 30 segundos a 62°C.
 - Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento gerado foi de 498 pb. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Ava</i> I (5' - C↓YCGRG -3')	0,5 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.
Digestão em banho maria por 5 minutos a 37°C	

Na presença do alelo C, foram originados dois fragmentos (438 pb e 60 pb), enquanto a presença do alelo T elimina o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando apenas um fragmento (498 pb). Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, sob corrente constante de 80 V por 45 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

- *PCR-RFLP para o polimorfismo -251A/T (IL8)*

- *primer sense IL81*: 5' - TTGGCTGGCTTATCTTCACC - 3'

- *primer antisense IL82*: 5' - GAAGCTTGTGTGCTCTGCTG - 3'

Mistura preparada para cada tubo de reação com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	11,3 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µL.
DMSO 100%	0,75 µL.
dNTP 5 mM	2,0 µL.
<i>Primer HIF1A1</i> 10 µM	2,5 µL.
<i>Primer HIF1A2</i> 10 µM	2,5 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 30 repetições
 - Desnaturação durante 30 segundos a 95°C.
 - Anelamento durante 45 segundos a 64°C.
 - Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 446 pb foi digerido de acordo com o protocolo:

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
-------------------------------	---------

Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>MfeI</i> (5' - C↓AATTG -3').....	0,5 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.

Digestão em banho maria a 37°C por 5 minutos.

Na análise do padrão de bandas resultantes, o alelo A gerou dois fragmentos (168pb e 298pb) e o alelo mutante T apenas um (446pb). A visualização foi feita em eletroforese em gel de agarose 2,0%, sob corrente constante de 80 V por 45 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

- *PCR-RFLP para o polimorfismo -308G/A (TNFA)*

- *primer sense TNFA1*: 5' - AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT - 3'

- *primer antisense TNFA2*: 5' - ACACTCCCCATCCTCCCGGCT - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	9,55 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µL.
dNTP 5 mM	5,0 µL.
<i>PrimerTNFA1</i> 10 µM	2,5 µL.
<i>PrimerTNFA2</i> 10 µM	2,5 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições de ciclagem:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos

- Ciclo de 35 repetições

Desnaturação durante 1 minuto e 30 segundos a 95°C.

Anelamento durante 1 minuto a 62°C.

Extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C.

- Extensão final durante 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento gerado foi de 117 pb. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Nco</i> I (5' - C↓CATGG -3')	0,5 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.
Digestão em banho maria por 5 minutos a 37°C.	

A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada em gel de agarose 4,0% submetido à eletroforese sob corrente constante de 80 V por 40 minutos, e corado com brometo de etídio. Na presença do alelo G, foram originados dois fragmentos (97 pb e 20 pb), enquanto o alelo A não possui o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando, então, apenas um fragmento (117 pb).

- *PCR-RFLP para o polimorfismo -509C/T (TGFB1)*

- *primer sense* TGFB1: 5' - CCGCTTCTGTCCTTTCTAGG - 3'

- *primer antisense* TGFB2: 5' - AAAGCGGGTGATCCAGATG - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	13,55 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µL.
dNTP 5 mM	2,0 µL.
<i>PrimerTGFB1</i> 10 µM	2,0 µL.
<i>PrimerTGFB2</i> 10 µM	2,0 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos

- Ciclo de 35 repetições

Desnaturação durante 30 segundos a 95°C.

Anelamento durante 30 segundos a 60°C.

Extensão de 30 segundos a 72°C.

- Extensão final durante 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 406 pb foi digerido de acordo com o protocolo:

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Bsu36 I</i> (5'- CC↓TNAGG -3')	0,5 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.

Digestão em banho maria a 37°C por 5 minutos.

Na presença do alelo C, foram originados dois fragmentos (223 pb e 183 pb), enquanto a presença do alelo T elimina o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando um fragmento (406 pb). Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

- *PCR-RFLP para os polimorfismos 1772C/T e 1790G/A (HIF1A)*

- *primer sense* HIF1A1: 5' - AAGGTGTGGCCATTGTAAACTC - 3'

- *primer antisense* HIF1A2: 5' - GCACTAGTAGTTTCTTTATGTATG - 3'

Mistura preparada para cada tubo de reação com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	11,3 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µL.
DMSO 100%	0,75 µL.
dNTP 5 mM	2,0 µL.
<i>Primer</i> HIF1A1 10 µM	2,5 µL.
<i>Primer</i> HIF1A2 10 µM	2,5 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 30 repetições
 - Desnaturação durante 30 segundos a 95°C.
 - Anelamento durante 30 segundos a 64°C.
 - Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 346 pb foi digerido de acordo com o protocolo:

Digestão para identificação da mutação 1772C/T

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Tsp45I</i> (5' - ↓GTSAC -3')	0,5 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.

Digestão em banho maria a 37°C por 5 minutos.

Digestão para identificação da mutação 1790G/A

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Acil</i> (5' - C↓CGC -3').....	0,5 µL.
Produto da PCR	5,0 µL.

Digestão em banho maria a 37°C por 5 minutos.

Para o polimorfismo 1772C/T, na presença do alelo C, foram originados três fragmentos (124 pb, 139 pb e 83 pb), enquanto o alelo T elimina um dos sítios reconhecidos pela enzima de restrição, gerando, então, apenas dois fragmento (263 pb e 83 pb). No polimorfismo 1790G/A, o alelo G gerou dois fragmentos (149 pb e 197 pb) e a presença do alelo A elimina o sítio de corte da enzima, sendo visualizado apenas um fragmento de 346 pb. A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada em gel de agarose a 2,5% submetido à eletroforese sob corrente constante de 80 V por 35 minutos, e corado com brometo de etídio.

- *PCR-RFLP para o polimorfismo -2578C/A (VEGFA)*

- *primer sense VEGFA1: 5' - GGATGGGGCTGACTAGGTAAGC - 3'*

- *primer antisense VEGFA2: 5' - AAGCCCCTTTTCCTCCAAC - 3'*

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H ₂ O Mili Q	11,6 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	1,0 µL.
DMSO100%	0,7 µL
dNTP 5 mM	2,0 µL.
<i>PrimerVEGFA1</i> 10 µM	2,5 µL.
<i>PrimerVEGFA2</i> 10 µM	2,5 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições de ciclagem:

- Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos

- Ciclo de 35 repetições

Desnaturação 30 segundos a 95°C.

Anelamento durante 30 segundos a 64°C.

Extensão de 30 segundos a 72°C.

- Extensão final durante 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento gerado foi de 324 pb. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

H ₂ O Mili Q	8,5 µL.
Tampão Fast Digest	1,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Bgl</i> II (5' - A↓GATCT -3')	0,5µL.
Produto da PCR	5,0 µL.
Digestão em banho maria por 5 minutos a 37°C	

Na presença do alelo C, a enzima não reconhece o sítio de restrição e, portanto, observa-se apenas o amplificado de 324 pb. O alelo mutante A cria um sítio de corte para a enzima, gerando dois fragmentos (202 pb e 122 pb). Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

APÊNDICE D – Artigo de Revisão publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ISSN: 1516-8484)



Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org



Review article

Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis



Lidiane de Souza Torres*, Jéssika Viviani Okumura, Danilo Grünig Humberto da Silva, Claudia Regina Bonini-Domingos

Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2014

Accepted 27 October 2014

Available online 23 February 2015

Keywords:

Hemoglobins

Haplotypes

Diagnosis

Hemoglobinopathies

ABSTRACT

This review discusses hemoglobin D-Punjab, also known as hemoglobin D-Los Angeles, one of the most common hemoglobin variants worldwide. It is derived from a point mutation in the beta-globin gene (HBB: c.364G>C; rs33946267) prevalent in the Punjab region, North-western Indian. Hemoglobin D-Punjab can be inherited in heterozygosis with hemoglobin A causing no clinical or hematological alterations, or in homozygosis, the rarest form of inheritance, a condition that is commonly not related to clinical symptomatology. Moreover, this variant can exist in association with other hemoglobinopathies, such as thalassemias; the most noticeable clinical alterations occur when hemoglobin D-Punjab is associated to hemoglobin S. The clinical manifestations of this association can be similar to homozygosis for hemoglobin S. Although hemoglobin D-Punjab is a common variant globally with clinical importance especially in cases of double heterozygosis, hemoglobin S/D-Punjab is still understudied. In Brazil, for example, hemoglobin D-Punjab is the third most common hemoglobin variant. Thus, this paper summarizes information about the origin, geographic distribution, characterization and occurrence of hemoglobin D-Punjab haplotypes to try to improve our knowledge of this variant. Moreover, a list of the main techniques used in its identification is provided emphasizing the importance of complementary molecular analysis for accurate diagnosis.

© 2015 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Mutations in genes encoding hemoglobin chains are present in about 7% of worldwide population.¹ These genetic alterations

can affect the production rate of globin chains and cause thalassemia, or they can modify molecule structure and generate hemoglobin variants.^{1,2}

Hemoglobin variants usually are the consequence of single amino acid substitutions caused by point mutations

* Corresponding author at: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil.

E-mail address: lidiane.unesp@gmail.com (L.S. Torres).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.02.007>

1516-8484/© 2015 Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

in genes encoding globin chains, resulting in a tetramer with different physicochemical characteristics.³ According to the Globin Gene Server database (<http://globin.cse.psu.edu/>), 1198 hemoglobin variants were described until September 2014. Most of the hemoglobin variants described do not cause symptomatic clinical manifestations; however, in some cases, they can be associated to relevant pathophysiology, e.g., hemoglobin S (Hb S). Hb S is the most frequent hemoglobin variant in the world; its clinical outcome is severe in homozygous or in association with other relatively common hemoglobinopathies, such as beta-thalassemia, Hb C or Hb D.^{3,4} Different to the other hemoglobinopathies, this last one is still poorly studied, especially in Brazil, where there are few recent studies about its prevalence, diagnosis and clinical aspects. Moreover, Hb D presents considerable geographic distribution and can be associated with Hb S, forming a heterozygous composite with peculiar clinical severity.

Thus, this study aimed to gather information available in the literature about type D hemoglobins, more specifically about Hb D-Punjab, in order to draw attention to its importance and to encourage the scientific community to take interest in the subject, particularly in Brazil where studies on this variant are scarce.

History

Until the early 1950s, only four types of hemoglobin had been described including adult hemoglobin (Hb A) and two variants (Hb S and Hb C). The fourth identified hemoglobin was Hb D which was first described by Itano in 1951. In his study, Itano was analyzing a multiethnic family from the Los-Angeles region with British, American and Indian features, and found a molecule with characteristics different to the other known hemoglobins. This hemoglobin had electrophoretic mobility similar to Hb S in alkaline pH, however, in acid pH, its migration resembled Hb A. Furthermore, Hb D exhibited normal solubility when in its reduced state and did not undergo sickling.^{5,6}

Since the discovery of this new variant and the knowledge of its molecular structure, other hemoglobins with similar patterns discovered in populations from different ethnicities have been nominated according to the regions in which they were described. In a study performed in 1962, Baglioni analyzed the molecular structure of five hemoglobins, Hb D-Chicago, Hb D-North Carolina, Hb D-Punjab, Hb D-Portugal and Hb D-Oak Ridge and found that all exhibited the same chemical composition as the first one discovered, Hb D-Los Angeles.^{6,7} The most frequent denominations for this mutant hemoglobin found in the literature are Hb D-Los Angeles or Hb D-Punjab.

Mutation $\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Gln}$ (GAA $\rightarrow$ CAA)

Hb D-Punjab is a variant derived from a point mutation in the beta-globin gene (HBB) in the first base of the 121 codon (GAA $\rightarrow$ CAA) with the substitution of glutamine for glutamic acid (Glu $\rightarrow$ Gln) in the beta globin chain.⁸ According to the Globin Gene Server database, besides Hb D-Punjab, there are seven other types of Hb D, caused by different point mutations in HBB. They are Hb D-Agri (HBB:c.29C>A;364G>C), Hb D-Bushman (HBB:c.49G>C),

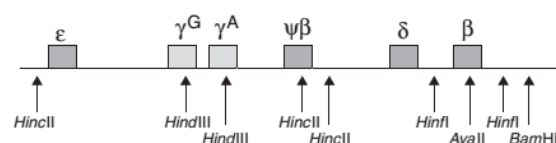


Figure 1 – Restriction polymorphic sites in cluster

beta-globin for haplotypes screening in association with Hb D-Punjab

Source: Modified from Yavarian et al.¹⁹

Hb D-Ouled Rabah (HBB:c.60C>A or 60C>G), Hb D-Iran (HBB:c.67G>C), Hb D-Granada (HBB:c.68A>T), Hb D-Ibadan (HBB:c.263C>A) and Hb D-Neath (HBB:c.365A>C).

Origin and geographic distribution

Hb D-Punjab is one of the most common hemoglobin variants worldwide, after Hb S and Hb C. It is prevalent in Punjab region, Northwest Indian, with an estimated frequency of 2.0%. In western India, more specifically in the Gujarat region, its frequency drops by one half.⁹

Hb D-Punjab is also common in countries such as Italy,¹⁰ Belgium,¹¹ Austria¹² and Turkey.¹³ Hb D-Punjab is the second most common hemoglobin alteration in Turkey; it occurs in 0.2% of the population of Denizli province in southeastern Turkey, where it is the most common variant. A total of 57.9% of abnormal hemoglobins observed in this province are Hb D-Punjab, followed by Hb S, with 21.9%.¹³ A similar frequency occurs in Xinjiang province, northwestern China, where 55.6% of variant hemoglobins are Hb D-Punjab.^{14,15}

In Brazil there are no recent studies reporting the frequency of Hb D-Punjab in the population, but in a large survey conducted in 1993 by Bonini-Domingos, which evaluated the prevalence of hemoglobinopathies in about 100,000 Brazilian individuals from every state in the country, Hb D-Punjab was observed to be the third most common hemoglobin variant in the population.¹⁶ Posteriorly, in a screening for hemoglobinopathies performed in a hospital-based population in southeastern Brazil by Sonati et al., the authors found hemoglobin alterations in 34.4% of the individuals, of which 0.4% corresponded to Hb D-Punjab. Despite the low frequency, Hb D-Punjab was also the third most frequent variant identified in this population.¹⁷

Initially, the geographic distribution of Hb D-Punjab suggests that this mutation originated in the central region of Asia, as it is prevalent in Punjab, a region of India, and Northwestern China. Then it spread to neighboring countries by migration.^{11,18,19} However, haplotype analysis of beta-globin clusters provides another insight into the origin of this hemoglobin. The analysis of polymorphic sites, 5'- ϵ HincII, γ^G HindIII, γ^A HindIII, $\psi\beta$ HincII, 3'- $\psi\beta$ HincII, 5'- β HinfI, β AvaII, 3'- β HinfI, 3'- β BamHI (Figure 1), showed certain haplotypes associated to Hb D-Punjab, suggesting a multicentric origin for this mutation.¹⁹⁻²⁴

The study of Atalay et al. considered seven beta-globin gene polymorphic sites (5'- ϵ HincII, γ^G HindIII, γ^A HindIII, $\psi\beta$ HincII, 3'- $\psi\beta$ HincII, β AvaII and 3'- β HinfI) and identified three

Table 1 – Haplotypes described in the literature associated with Hb D-Punjab and the locations where they were first found.

Polymorphic sites of cluster beta									Occurrence
5'-ε HincII	γ ^G HindIII	γ ^A HindIII	ψβ HincII	3'-ψβ HincII	5'-β HinfI	β AvaII	3'-β HinfI	3'-β BamHI	
+	–	–	–	–	NR	+	NR	+	Mexico, ^{18,20} Italy, ^{10,18} Iran ^{18,21}
+	–	–	–	–	NR	+	+	NR	Turkey, ^{18,22} India ¹⁹
–	+	+	–	+	NR	+	NR	+	Thailand ^{18,18}
–	+	+	–	+	NR	+	+	NR	Turkey ¹⁸
–	+	–	–	+	NR	+	+	NR	Turkey ¹⁸
–	–	+	–	+	NR	+	+	NR	Turkey ²²
+	–	–	–	–	+	NR	+	NR	Iran, the Netherlands, Belgium ¹⁷
+	–	–	–	–	–	NR	+	NR	Iran ¹⁷
–	+	–	–	+	+	NR	+	NR	Iran ¹⁷
–	+	–	+	+	+	NR	+	NR	Iran, India, England ¹⁷

NR: not reported.

haplotypes. One of them is the Mediterranean Haplotype I (+ – – – – +) which is the most common and found in populations of Mexico,²² Italy¹⁰ and Iran.²³ A second recently discovered pattern was associated to Hb D-Punjab cases in Thailand (– + + – + +)⁸ and the third haplotype was found in Turkish populations (– + – – + +).²⁰

In 2009, Yavarian et al. analyzed seven polymorphic sites (5'-ε HincII, γ^G HindIII, γ^A HindIII, ψβ HincII, 3'-ψβ HincII, 5'-β HinfI and 3'-β HinfI) and found four haplotype patterns associated to Hb D-Punjab in the Indian population. The first and most common was the Mediterranean Haplotype I (+ – – – – +), the second seems to be a product of the Mediterranean Haplotype I variation probably due to an independent mutation (+ – – – – +), the third was the same haplotype found in Turkey (– + – – + +), and the fourth a common haplotype in Indian and English populations (– + – + + +).¹⁹

Considering the same restriction sites assessed by Atalay et al. in 2007 and in 2009, Bahadır et al. reported the occurrence of another haplotype in the Turkish population (– – + – + +).^{20,24} Due to lack of studies in Chinese and Indian populations, Patel et al. evaluated individuals with Hb D-Punjab from Agharia in India and found another haplotype (– – – – – +) in addition to haplotype I (+ – – – – +).²¹ Table 1 summarizes all these results.

As the haplotypes described in association with Hb D-Punjab are prevalent in different regions, it is suggested that the origin of the mutation in codon β121 may be multicentric. According to Yavarian et al., one important aspect is that the mutation site is located in a short palindromic region, where many mutations are described, suggesting that codon β121 exhibits a higher mutation rate than is expected. Thus, there is a chance that mutational events give rise to the same hemoglobin in different regions.¹⁹ However, it is not yet possible to confirm the origin and distribution of this hemoglobin as there are few studies about haplotypes in populations from China²⁰ and from other continents such as North, South and Central America and Africa. In Brazil, no study has been performed to screen haplotypes associated to Hb D-Punjab.

Inheritance of Hb D-Punjab and associated clinical features

The Hb D-Punjab can be inherited in heterozygosis with normal Hb A, characterizing the heterozygous trait. This condition presents no clinical or hematological alterations. The homozygous component Hb DD, the rarest form of inheritance, is not commonly related to symptomatic cases, but occasionally individuals with this profile can develop mild to moderate hemolytic anemia.^{25,26}

The association of this variant with other abnormal hemoglobins, such as Hb S or thalassemia can also occur. Usually, interactions between Hb D-Punjab and beta thalassemia course with mild microcytic and hypochromic anemia, but do not present relevant clinical or hematological changes.²⁷

However, when Hb D-Punjab is associated to Hb S, the double heterozygous Hb S/D, the result is moderate to severe clinical manifestations; this association can be clinically similar to homozygous Hb SS.²⁵ Pain, due to vaso-occlusive events, is one of the most common complications. Furthermore, stroke and acute chest syndrome can occur in carriers of this genotype.^{28–30}

Recently, Patel et al. published a study on Hb S/D-Punjab patients with moderate to severe clinical symptomatology similar to the Hb SS genotype who had vaso-occlusion episodes or required blood transfusions. The authors observed greater vulnerability for red cell lysis in Hb S/D-Punjab patients than with the Hb SS genotype.³¹ Clinical severity in Hb S/D-Punjab individuals could be related to the fact that Hb D favors polymerization of Hb S.³²

Polymerization of Hb S molecules is triggered by hydrophobic interactions between the Val-β6 amino acid of an Hb S molecule and the Phe-β85 and Leu-β88 amino acids of adjacent hemoglobin molecules. Subsequently, these hydrophobically associated Hb S molecules interact with other contact sites of Hb S polymers, such as β73 and β121, resulting in the formation of a complex polymer structure. Thus, mutations in these contact sites can affect the biochemical properties of the Hb S polymers formed. It is believed that

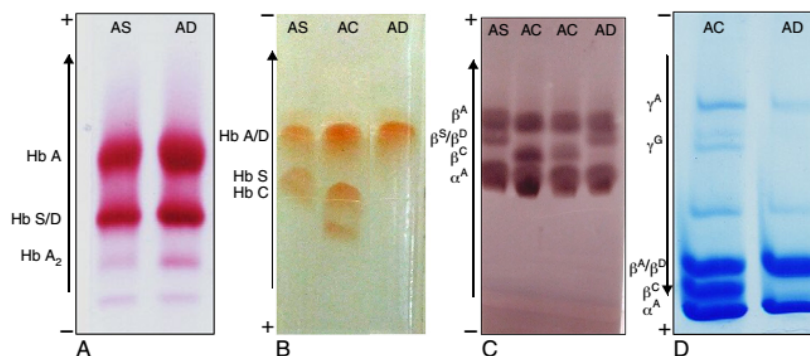


Figure 2 – Electrophoretic mobility of Hb D-Punjab compared to other known hemoglobins, such as Hb A, S and C. Images correspond to hemoglobin electrophoresis in cellulose acetate (A), hemoglobin electrophoresis in agarose gel (B), polypeptide chains electrophoresis in cellulose acetate (C) and polypeptide chains electrophoresis in polyacrylamide gel (D). The genotypes of each sample are at the top of the figure. Current direction and position of the different hemoglobins are beside each method.

the amino acid changes in the $\beta 121$ Glu→Gln position encourage the interaction of Hb S molecules and consequently its polymerization.^{33,34} Adachi et al. showed that the Hb S polymerization rate is higher when Hb D-Punjab is present. This may explain the clinical severity of sickle cell disease in double heterozygous Hb S/D-Punjab, as Hb D-Punjab increases the probability of sickling due to a shorter transit time of these cells in the blood capillaries.³²

Hydroxyurea (HU) administration is a potential therapeutic strategy for sickle cell anemia (Hb SS), showing efficacy in increasing Hb F levels and consequently reducing the number of painful crises, acute chest syndrome, transfusions, and hospitalizations. However, HU therapy for Hb S/D-Punjab has not been established. Patel et al. treated Hb S/D-Punjab patients using low doses (10 mg/kg/day) of HU noticed an effective reduction in the incidence of vaso-occlusion and the frequency of blood transfusions. These results suggest that HU is a promising therapy for clinical symptomatology in Hb S/D-Punjab individuals.³¹

Laboratory diagnosis

Numerous laboratory methods are used to diagnose hemoglobin variants and thalassemias.

Hemoglobins can be separated by electrophoresis in cellulose acetate at pH 8.6³⁵ and in agarose gel at pH 6.2.³⁶ In cellulose acetate, the migration of Hb D is slower than Hb A with a position similar to Hb S, but in acid pH its migration position is the same as Hb A. These electrophoretic patterns, however, are not specific for variants of the Hb D group, as there are other hemoglobin variants with similar behavior, such as Hb G and Hb Korle-bu.

The structural characterization of hemoglobin variants by electrophoretic separation of hemoglobin polypeptide chains is used in cases in which the results of the initial tests are inconclusive.^{37,38} The mutant β^D chain migrates similar to the β^S chain using this method, but slightly below this fraction

in alkaline pH, while it migrates to the same position as the normal β^A chain in acid pH (Figure 2).

It is also possible to separate hemoglobins according to their isoelectric point (pI) by isoelectric focusing (IEF).³⁹ In the case of Hb D-Punjab, its pI is near to pH 7.1, a position similar to other hemoglobin variants such as Hb Korle-Bu (Figure 3). Although it has great resolution, this technique requires specific kits and is more expensive than conventional electrophoresis.

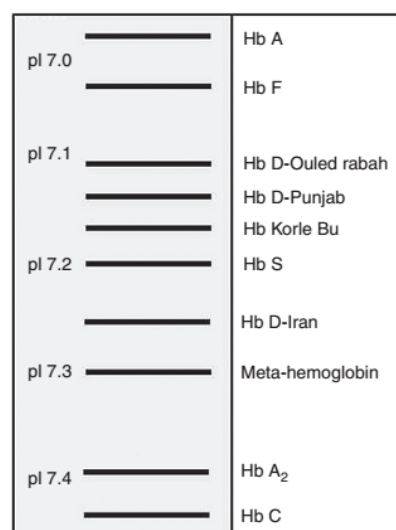


Figure 3 – Schematic representation of relative mobilities of different hemoglobins using the isoelectric focusing method. Hb D-Punjab is shown in the figure with isoelectric point (pI) between 7.1 and 7.2.

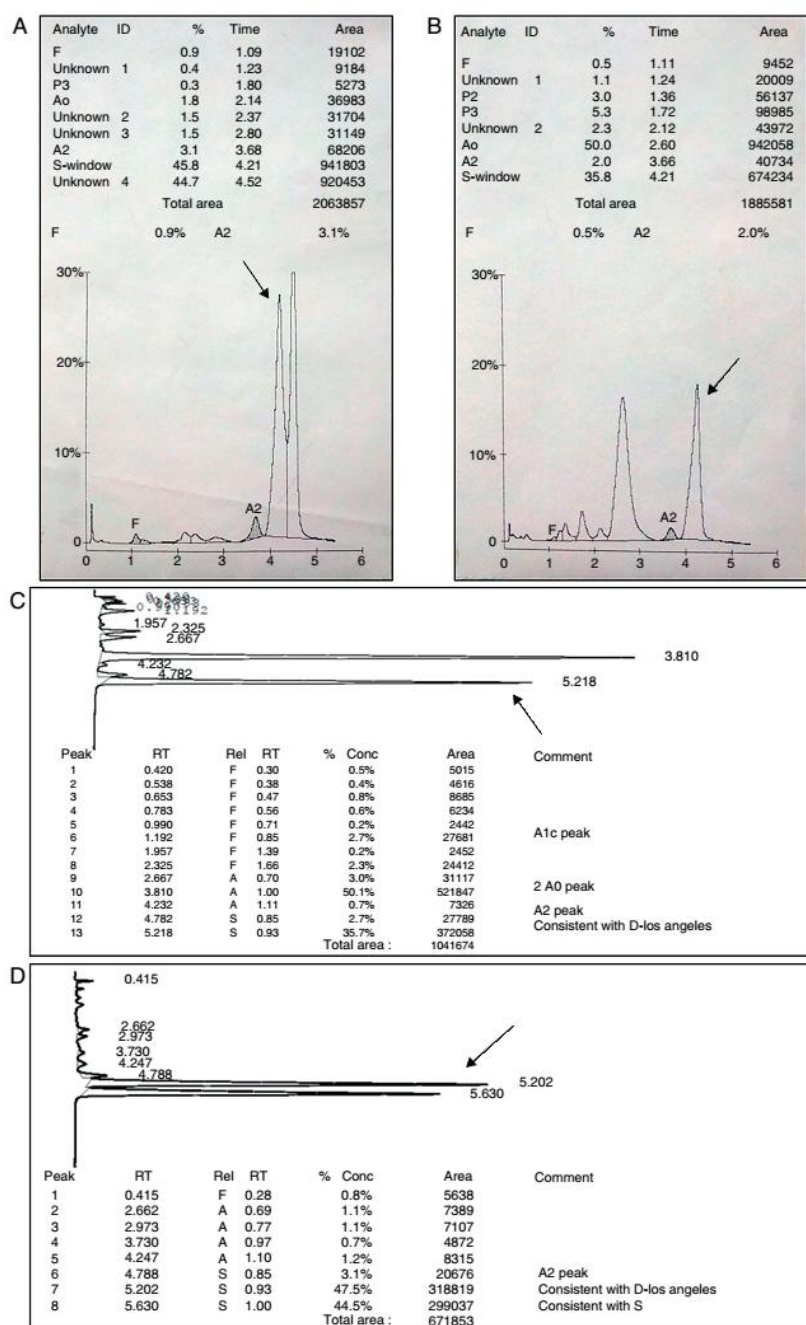


Figure 4 – Chromatographic profile of a heterozygous trait for Hb D-Punjab (B and C) and a double heterozygous Hb S/D-Los Angeles A and D). (A and B) The VARIANT I system chromatogram with heterozygous beta-thalassemia analysis kit. The arrow indicates the pike corresponding to Hb D-Los Angeles with average retention time of 4.1–4.3 min. It is possible to note decreases in Hb A2 values, a characteristic of samples with this hemoglobin variant. (C and D) The ultra2 Resolution system chromatogram with Genesys analysis kit. The arrow indicates the Hb D-Punjab spike, with retention time between 0.92 and 0.96 min related to Hb S.

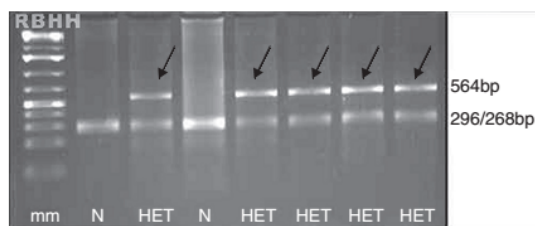


Figure 5 – Agarose gel visualization of fragments generated by the PCR-RFLP technique for screening of $\beta 121$ Glu $\rightarrow$ Gln (GAA $\rightarrow$ CAA) mutation. Normal alleles generate two fragments and mutant alleles maintain the 564bp fragment, indicated by the arrows. N: absent mutation; HET: heterozygous for Hb D-Los Angeles; mm: molecular marker of 100bp. Restriction enzyme: EcoRI (G $\downarrow$ AATTC).

High performance liquid chromatography (HPLC) methods have been developed for hemoglobin fractionation with high sensitivity and specificity. This technique is an integrated method based on ion-exchange to separate and identify the relative percentage of specific hemoglobins in whole blood samples (Figure 4). Another method employed to detect hemoglobin fractions is capillary electrophoresis (CE) based on the principle of electrokinetic separation. Despite the excellent resolution and reproducibility, this technique is only now arriving in some countries, including Brazil.

Reverse-phase HPLC (RP-HPLC) of human globin chains has been reported as an important tool for detecting hemoglobinopathies. Nevertheless, although it is widely used for the detection, quantification and purification of many proteins from biological materials, its clinical application for hemoglobins is still limited due to the long analytical time, complex sample preparation and resolution problems.^{40,41} Recently, studies have had success in optimizing the method,^{40,41} but in many laboratories the technique is still employed exclusively for research.

Although all these tests aim to diagnose Hb D-Punjab, they are not considered conclusive because of the large number of hemoglobin variants that are similar to each other. It is always recommended to perform molecular analysis for genotype confirmation with PCR-RFLP as an alternative⁴² (Figure 5).

When the Hb D variant is not identified by the above-mentioned methodologies, sequencing of beta-globin gene or other techniques that discriminate amino acid changes are recommended.

Using these methodologies over the last 10 years, 70 cases of type D hemoglobins from southeast Brazil were diagnosed in the Hemoglobin and Hematological Genetic Diseases Laboratory of the Universidade Estadual Paulista (UNESP) a referral center for hemoglobin diagnosis. Of these, 66 (94.3%) had a profile compatible to Hb D-Punjab, eight (12.1%) were compound heterozygous Hb S/D-Punjab and 58 (87.9%) heterozygous Hb A/D-Punjab, all of which were confirmed by molecular tests. The other four remaining cases presented electrophoretic and chromatographic profiles compatible with the "Hb A/D-non-Los Angeles" trait, possibly Hb A/D-Iran (data not published).

Conclusion

Although not always associated with relevant clinical history, Hb D-Punjab is a relatively common hemoglobin worldwide; it is the third most common hemoglobin variant in Brazil. Greater attention is given when the association of Hb D-Punjab with another abnormal hemoglobin or thalassemia leads to clinical symptoms. However, this issue is still understudied especially in Brazil and the pathophysiological mechanisms caused by Hb D-Punjab are poorly known. There is no recent information about the prevalence of Hb D-Punjab, association with other hemoglobin variants, or characterization of typical haplotypes in the Brazilian population. Therefore, it is important to conduct studies about this hemoglobin variant.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Foundation for Research Support of the State of São Paulo) – FAPESP, by supporting research in our laboratory (process number 2012/19653-1). In addition, to thank Lucas Pereira Ramos for English text revision.

REFERENCES

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79(8):704–12.
2. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(31/32):532–40.
3. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(3):a011858.
4. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007;117(4):850–8.
5. Itano HA. A third abnormal hemoglobin associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1951;37(12):775–84.
6. Vella F, Lehmann H. Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). *J Med Genet.* 1974;11(4):341–8.
7. Baglioni C. Abnormal human haemoglobins. VII. Chemical studies on haemoglobin D. *Biochim Biophys Acta.* 1962;59(2):437–49.
8. Fucharoen S, Changtrakun Y, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K. Molecular characterization of Hb D-Punjab $\beta 121$ (GH4)Glu $\rightarrow$ Gln in Thailand. *Hemoglobin.* 2002;26(3):261–9.
9. Kösele A, Öztürk O, Atalay A, Atalay EÖ. Allele frequency of VNTR locus D1S80 observed in Hb D-Los Angeles carriers. *Mol Biol Rep.* 2012;39(12):10747–50.
10. Fioretti G, De Angioletti M, Pagano L, Lacerra G, Viola A, de Bonis C, et al. DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles $\beta 121$ (GH4)Glu $\rightarrow$ Gln in Southern Italy. *Hemoglobin.* 1993;17(1):9–17.
11. Husquinnet H, Parent MT, Schoos-Barbette S, Dodinval-Versie J, Lambotte C, Galacteros F. Hemoglobin D-Los Angeles

- β121(GH4)Glu→Gln in the province of Liege Belgium. *Hemoglobin*. 1986;10(6):587-92.
12. Lischka A, Pollak A, Bauer K, Aschauer H, Braunitzer G. Hemoglobin D "Los Angeles" in an Austrian family: biochemical identification, clinical aspects, and kindred study. *Hemoglobin*. 1984;8(4):353-61.
 13. Atalay EÖ, Koyuncu H, Turgut B, Atalay A, Yıldız S, Bahadır A, et al. High incidence of Hb D-Los Angeles β121(GH4) Glu→Gln in Denizli province Aegean region of Turkey. *Hemoglobin*. 2005;29(4):307-10.
 14. Li HJ, Zhao XN, Qin F, Li HW, Li L, He XJ, et al. Abnormal hemoglobins in the silk road region of China. *Hum Genet*. 1990;86(2):231-5.
 15. Pandey S, Mishra RM, Pandey S, Shah V, Saxena R. Molecular characterization of hemoglobin D Punjab traits and clinical-hematological profile of the patients. *Sao Paulo Med J*. 2012;130(4):248-51.
 16. Bonini-Domingos CR. Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil – Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial. 144f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas. São José do Rio Preto, SP: Univ. Estadual Paulista – Unesp; 1993.
 17. Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZ, Gervasio SA, Costa FF. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. *Hemoglobin*. 1996;20(2):175-9.
 18. Brittenham GM. Globin gene variants and polymorphism in India. In: Winter WP, editor. *Hemoglobin variants in human populations*. Florida: CRC Press Inc.; 1988. p. 79-110.
 19. Yavarian M, Karimi M, Paran F, Neven C, Harteveld CL, Giordano PC. Multi Centric origin of Hb D-Punjab β121(GH4)Glu→Gln, GAA>CAA. *Hemoglobin*. 2009;33(6):399-405.
 20. Atalay EÖ, Atalay A, Ustel E, Yıldız S, Öztürk O, Kösele A, et al. Genetic origin of Hb D-Los Angeles β121(GH4)Glu→Gln, GAA→CAA according to the β-globin gene cluster haplotypes. *Hemoglobin*. 2007;31(3):387-91.
 21. Patel DK, Mashon RS, Patel S, Dash PM, Das BS. β-Globin gene haplotypes linked with the Hb D-Punjab β121(GH4)Glu→Gln, GAA→CAA mutation in eastern India. *Hemoglobin*. 2010;34(6):530-7.
 22. Perea FJ, Casas-Castañeda M, Villalobos-Arámbula AR, Barajas H, Alvarez F, Camacho A, et al. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or β-thalassemia in four Mexican Mestizo families. *Hemoglobin*. 1999;23(3):231-7.
 23. Rahimi Z, Akramipour R, Nagel RL, Ahmadi AS, Merat A, Bahrehmand F. The β-globin gene haplotypes associated with Hb D-Los Angeles β121(GH4)Glu→Gln in Western Iran. *Hemoglobin*. 2006;30(1):39-44.
 24. Bahadır A. Hb D-Los Angeles beta121(GH4)Glu→Gn and Hb Beograd beta121(GH4)Glu 1 Val: implications for their laboratory diagnosis and genetic origins. *Turk J Hematol*. 2009;26(1):17-20.
 25. Adekile A, Muah-Ali A, Akar NA. Does elevated hemoglobin F modulate the phenotype in Hb SD-Los Angeles? *Acta Haematol*. 2010;123(3):135-9.
 26. Taghavi Basmanj M, Karimipour M, Amirian A, Jafarinejad M, Katouzian L, Valaei A, et al. Co-inheritance of hemoglobin D and β-thalassemia traits in three families: clinical relevance. *Arch Iran Med*. 2011;14(1):61-3.
 27. Naoum PC, Moraes MS, Radispiet J, Cavalheri PP, Valeri FF. Hb D/Talassemia beta associada à anemia crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24(1):51-2.
 28. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288-94.
 29. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood*. 1994;84(2):643-9.
 30. Hamidieh AA, Jalili M, Khojasteh O, Ghavamzadeh A. First report of successful stem cell transplantation in a patient with sickle cell hemoglobin D disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32(5):397-9.
 31. Patel S, Purohit P, Ranjeet SM, Dehury S, Meher S, Sahoo S, et al. The effect of hydroxyurea on compound heterozygotes for sickle cell-hemoglobin D-Punjab—a single centre experience in eastern India. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(8):1341-6.
 32. Adachi K, Kim J, Ballas S, Surrey S, Asakura T. Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at β121. *J Biol Chem*. 1988;263(12):5607-10.
 33. Charache S, Conley CL. Rate of sickle cells during deoxygenation of blood from persons with various sickling disorders. *Blood*. 1964;24:25-48.
 34. Benesch RE, Kwong S, Benesch R, Edalji R. Location and bond type of intermolecular contacts in the polymerization of haemoglobin S. *Nature*. 1977;269(5631):772-5.
 35. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. *J Clin Pathol*. 1965;18(6):790-2.
 36. Vella F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am J Clin Pathol*. 1968;49(3):440-2.
 37. Schneider RG. Differentiation of electrophoretically hemoglobins – such as S, D, G and P or A2, C, E, and O – by electrophoresis of the globin chains. *Clin Chem*. 1974;20(9):1111-5.
 38. Alter BP, Goff SC, Efremov GD, Gravelly ME, Huisman TH. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G/A ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Br J Haematol*. 1980;44(4):527-32.
 39. Naoum PC. Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda; 1990.
 40. Nemat H, Bahrami G, Rahimi Z. Rapid separation of human globin chains in normal and thalassemia patients by RP-HPLC. *Mol Biol Rep*. 2011;38(5):3213-8.
 41. Wan JH, Tian PL, Luo WH, Wu BY, Xiong F, Zhou WJ, et al. Rapid determination of human globin chains using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;15(901):53-8.
 42. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.

APÊNDICE E – Artigo científico publicado na *Cytokine* (ISSN: 1043-4666)



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.journals.elsevier.com/cytokine

Plasma levels of TGF- β 1 in homeostasis of the inflammation in sickle cell disease



Lidiane de Souza Torres^{a,*}, Jéssika Viviani Okumura^a, Danilo Grünig Humberto da Silva^a,
Édis Belini Júnior^a, Renan Garcia de Oliveira^a, Kallyne Kioko Oliveira Mimura^b,
Clarisse Lopes de Castro Lobo^c, Sonia Maria Oliani^b, Claudia Regina Bonini Domingos^a

^a Laboratory of Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases, Department of Biology, Sao Paulo State University (Unesp), Rua Cristóvão Colombo, 2265, São Jose do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

^b Laboratory of Immunomorphology, Department of Biology, Sao Paulo State University (Unesp), Rua Cristóvão Colombo, 2265, São Jose do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

^c Institute of Hematology Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), Rua Frei Caneca, 08, Rio de Janeiro, RJ 20211-030, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2015

Received in revised form 20 February 2016

Accepted 23 February 2016

Keywords:

Transforming growth factor

Cytokines

Platelets

Sickle cell anemia

Sickle cell disease

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) represents a chronic inflammatory condition with complications triggered by the polymerization of hemoglobin S (Hb S), resulting in a series of cellular interactions mediated by inflammatory cytokines, as the transforming growth factor beta (TGF- β), which plays an important role in inflammation resolution. This study assessed the relation between SCD inflammation and the plasma concentration of TGF- β 1, and also checked the influence of the presence of –509C/T polymorphism in *TGFB1* gene on TGF- β 1 plasma values. The plasma levels of TGF- β 1 were quantified by ELISA in 115 patients with SCD (genotypes SS, SD-Los Angeles, S β -thalassemia and SC) and in 58 individuals with no hemoglobinopathies (Hb AA), as the control group. The –509C/T polymorphism in *TGFB1* gene was screened by PCR-RFLP. The correlation between TGF- β 1 plasma levels and the inflammation was based on its association with the count of platelets, total white blood cells (WBC) and neutrophils in the peripheral blood. Patients with SCD showed plasma levels of TGF- β 1 higher than the control group, especially the Hb SS genotype, followed by the group with Hb SD. Polymorphism investigation showed no interference in the values obtained for the cytokine in the groups evaluated. All SCD groups showed TGF- β 1 levels positively correlated to the platelets and WBC counts. The original data obtained in this study for SCD support the involvement of TGF- β 1 in regulating of the inflammatory response and suggest that this marker possibly may become a potential therapeutic target in the treatment of the disease.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) comprehends the group of hemolytic anemia caused by the presence of hemoglobin S (Hb S), either in homozygosis (sickle cell anemia), or in association with other hemoglobin variants or thalassemias [1]. Hb S originates from a point mutation in the beta globin gene (*HBB*:c.20A > T; rs334) resulting in replacement of glutamic acid for valine in the polypeptide chain, causing structural and biochemical modifications in the hemoglobin molecule [1–3]. Sickle cell anemia is the most common form of the disease, as well as the most severe. The association of Hb S with other variants such as Hb C (*HBB*:c.19G > A; rs33930165) and Hb D-Los Angeles (*HBB*:c.364G > C; rs33946267) are less frequent and less severe, while its association

with beta thalassemia results in moderate to severe clinical types, depending on the beta-thalassemia mutation inherited [1,4].

Complications of SCD start with the polymerization of Hb S, erythrocyte sickling, exposure of membrane proteins, hemolytic anemia and ischemia-reperfusion cycles. These recurrent cycles result from vascular occlusion and represent the main stimulus for the inflammatory process, due to endothelial dysfunction, increased vascular inflammation, coagulation activation and oxidative stress created during the restoration of blood flow [5]. Although it plays a protective role in the infection control and promotes tissue repair, the exaggerated inflammatory response can also cause tissue damage. In SCD, inflammation may occur in acute and chronic forms, due to polymerization of Hb S, which not only results in erythrocyte sickling and intravascular hemolysis, but also a series of cellular interactions mediated by inflammatory cytokines [6].

The transforming growth factor beta (TGF- β) is a pleiotropic cytokine that affects cell proliferation, survival and migration and

* Corresponding author.

E-mail address: lidiane.unesp@gmail.com (L.S. Torres).

might act as both positive and negative regulator during gene transcription, depending on the target genes and cellular context. It exists in three isoforms: TGF- β 1, 2 and 3, whereas TGF- β 1 is the most abundant [7]. TGF- β plays an important role in inflammation resolution, since it is associated with the inhibition of immune cells proliferation and the activity suppression of immune system precursor cells. It also acts as a potential inhibitor on T cells differentiation and apoptosis inducer in B cells, besides participating in the chemotaxis and polarization of macrophages and neutrophils at the inflammation site. On the other hand, it is involved in the releasing of proinflammatory cytokines from neutrophils and in stimulating pro-inflammatory Th17 cells lineage differentiation [8,9].

The TGF- β production can be controlled by single nucleotide polymorphisms (SNP) in its gene, such as the –509C/T on *TGFB1* (rs1800469), wherein the mutant allele T is associated with high circulating levels of TGF- β 1 [10]. The elevation in the TGF- β 1 levels has been described in sickle cell anemia [11,12] and genetic polymorphisms in *TGFB*, its receptors and members of its activation pathway were related to subphenotypes of the disease, including clinical complications such as myocardial infarction, osteonecrosis, priapism, leg ulcer and pulmonary hypertension [13].

In the present study we built on the observation of the inflammatory condition in SCD patients – genotypes SS, SD-Los Angeles (SD), S/beta-thalassemia (S β -thal) and SC – based on the association of TGF- β 1 plasma levels to the total amount of white blood cells (WBC), neutrophils and platelets in the peripheral blood. In addition, we evaluated the relation between the –509C/T polymorphism in the *TGFB1* gene and the TGF- β 1 plasma values.

2. Methods

2.1. Subjects

The study consisted of 115 SCD patients from the Arthur de Siqueira Cavalcanti Institute of Hematology (Hemorio) in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. In order to minimize biases in the analysis, all patients were selected according to exclusion criteria, namely: anti-inflammatory prescription for three weeks prior to sample collection, use of hydroxyurea for up to six months preceding the collection date and blood transfusions carried out in <60 days (or Hb A > 10.0%) [14]. In addition, only individuals over 10 years old were included in the study, since at this age the hemoglobin profile is usually stable [15]. Fifty-eight volunteers, adults of both genders and with normal hemoglobins, without the use of anti-inflammatory drugs for three weeks, were part of the control group. The work has the approval by the Research Ethics Committee from Sao Paulo State University (UNESP) under Certificated of Presentation for Ethics Consideration (CAAE) number 08813112.7.0000.5466.

2.2. Samples, hemoglobin profile and genotyping for SCD

Peripheral blood samples (5 ml) were collected into tubes containing 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant. The hemoglobin migration pattern was evaluated by electrophoresis on cellulose acetate at pH 8.6 [16] and agar-agar gel electrophoresis at pH 6.2 [17]. The red cell morphology was analyzed in light microscope with 40 $\times$ objective lens. The quantification of the hemoglobin fractions was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) by VARIANT™ automated equipment (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

To confirm SCD genotype by molecular biology, DNA was extracted from leukocytes by phenol-chloroform method [18]

and then subjected to polymerase chain reaction followed by restriction fragment analysis (PCR-RFLP) for identification of mutations that result in hemoglobins S, C, and D-Los Angeles (Table 1) [19].

After genotyping, individuals were separated into four SCD study groups: Hb SS, Hb SD, Hb S β -thal and Hb SC; and the control group: Hb AA.

2.3. TGF- β 1, platelets and WBC

The –509C/T polymorphism in the *TGFB1* gene was screened by PCR-RFLP using primers sense 5'- CCGCTTCTGCTCTTCTAGG - 3' and antisense 5'- AAAGCGGGTGATCCAGATG - 3'. The reaction mix consisted of 1 $\times$ reaction buffer, MgCl₂ (5 mM), dNTPs (0.4 mM), 0.8 mM of each primer, 1 unit of Taq polymerase and 12 ng/ μ L of DNA. The cycling conditions applied were: 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension of 7 min at 72 °C. The 406 bp fragment was treated with *Bsu*36 I restriction enzyme (5'-TNAG G↓CC-3'), which recognizes the cleavage site in the presence of the normal allele C and generates two fragments: 223 bp and 183 bp. The fragments were visualized on 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

The plasma levels of TGF- β 1 cytokine were evaluated by multiplex instrument LUMINEX xMAP MAGPIX (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The platelets, WBC and neutrophils count was carried out by flow cytometry and spectrophotometry methods.

2.4. Statistical analysis

The *chi-square* and *Fisher's exact* tests were applied to the genotypic and allelic frequencies analysis of the –509C/T (*TGFB1*) polymorphism in the study groups. The relationship between plasma levels of TGF- β 1 and the –509C/T polymorphism, as well as TGF- β 1 levels between the SCD and control groups, were evaluated by *Student's t-test* or *Mann-Whitney* test, depending on nature of the data (parametric or non-parametric distribution). The TGF- β 1, platelets, WBC and neutrophils comparisons among the four SCD genotypes were performed using the *one-way Anova* followed by *post hoc Tukey-Kramer*. Relations between circulating levels of the markers were evaluated by *Pearson* correlation test. Simple linear regression analysis was applied to verify the dependence of TGF- β 1, platelets and WBC variables. In all cases, non-parametric data were transformed into square root or base-10 logarithm in an attempt to prioritize the use of parametric tests. The adopted confidence interval was 95%, with a significance level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterization of the study groups

After characterization of the 115 samples obtained from patients with SCD, 67 (58.3%) were from patients with Hb SS, 30 (26.1%) with Hb SC, 10 (8.7%) with Hb S β -thal and eight (6.9%) with Hb SD. All 58 control subjects were confirmed with Hb AA profile. The hemoglobin profile presented by the five study groups are detailed in Table 2.

3.2. –509C/T polymorphism frequency and its influence on circulating levels of TGF- β 1

The –509C/T polymorphism was investigated in all samples. In the case group we found 39.1% of the CT genotype and 9.6% of TT

Table 1

Initiator oligonucleotides and products generated in the molecular analyzes for identification of SCD genotypes by PCR-RFLP.

Mutation	Primers	Size of amplified sequence	Restriction enzyme	Size of the generated fragment for each allele
Hb S (HBB:c.20A > T)	F: 5'-GGCAGAGCCATCTATTGCTTA-3' R: 5'-ACCTTAGGTTGCCATAAC-3'	382 bp	DdeI (5'-C ₁ TNAG-3')	A: 201 bp, 88 bp, 87 bp and 6 bp T: 288 bp, 88 bp and 6 bp
Hb C (HBB:c.19G > A)			BseRI (5'-GAGGAG(N) _{10/8} -3')	G: 278 bp and 104 bp A: 382 bp
Hb D-Los Angeles (HBB:c.364G > C)	F: 5'-TGCCTCTTTGCACATTCTA-3' R: 5'-GA CTCCACATTCCCTTTT-3'	564 bp	EcoRI (5'-G ₁ AATTC-3')	G: 296 bp and 268 bp C: 564 bp

F: Forward; R: Reverse. bp: base pairs.

Table 2

Characterization of the study groups and hemoglobin profile of the samples.

Characteristics	Control Hb AA n = 58	Case Hb SS n = 67	Hb SD n = 8	Hb S β -thal n = 10	Hb SC n = 30
Age [years]					
$\bar{x} \pm SD$	28.9 $\pm$ 10.3	25.5 $\pm$ 11.6	23.1 $\pm$ 12.3	35.1 $\pm$ 14.4	25.6 $\pm$ 13.8
Median $\pm$ IQR	26.0 $\pm$ 7.0	21.7 $\pm$ 19.0	19.6 $\pm$ 19.6	39.4 $\pm$ 21.3	20.8 $\pm$ 20.7
Gender [n (%)]					
Female	21 (36.2)	47 (70.1)	3 (37.5)	4 (40.0)	11 (36.7)
Male	37 (63.8)	20 (29.9)	5 (62.5)	6 (60.0)	19 (63.3)
Hb profile (%; $\bar{x} \pm SD$)					
Hb A ₂	3.1 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 1.1 ^a	2.7 $\pm$ 0.4 ^a	5.7 $\pm$ 1.0 ^a	4.2 $\pm$ 0.4 ^a
Hb F	0.3 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 4.9 ^b	6.2 $\pm$ 3.5 ^b	5.0 $\pm$ 6.4 ^b	1.5 $\pm$ 1.2 ^b
Hb S	–	85.4 $\pm$ 11.3	43.9 $\pm$ 2.9	67.5 $\pm$ 10.2	47.9 $\pm$ 0.9
Hb D	–	–	42.7 $\pm$ 1.7	–	–
Hb C	–	–	–	–	42.2 $\pm$ 2.5

 $\bar{x} \pm SD$: mean $\pm$ standard deviation. IQR: interquartile range. Hb profile data obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) by VARIANTTM automated equipment (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Reference values: Hb A₂ (2.5–3.5%); Hb F (0.0–1.0%).^a Increased concentrations for Hb A₂ in SCD groups are due to Hb S acetylating (acetylated Hb S elutes like Hb A₂).^b Increase in Hb F concentration is expected to SCD condition.

homozygotes. In the control group, the rate was 51.7% and 13.9%, respectively. The frequencies between the case and control groups were not statistically different ($p = 0.11$) and there was also no difference between the four genotypes of the disease ($p = 0.05$). The allele frequency observed in the SCD group was 0.7 for the C allele and 0.3 for the T allele, and in the control group was 0.6 and 0.4, respectively. There was no difference in frequencies between the case and control groups ($p = 0.05$) and within groups with SCD ($p = 0.06$). The data for all groups are shown in Table 3.

We evaluated the influence of the –509C/T (TGFB1) polymorphism in the plasma levels of TGF- β 1. For this, due to the small sample size in the Hb SD and Hb S β -thal genotypes we grouped the polymorphism in two groups: the absence of the mutant allele (CC) and the presence of the mutant allele (CT + TT). We did not observe changes in TGF- β 1 plasma levels in the presence of the mutant T allele in control and case groups evaluated (Table 4).

3.3. Circulating levels of TGF- β 1, platelets and WBC in SCD

The plasma levels of TGF- β 1 in the SCD group were quantified and compared to the values presented by the control group. We observed an average increase twice the amount of this cytokine in the plasma of patients (median and interquartile range: 348.0 $\pm$ 374.0 pg/mL) compared to the control group (median and interquartile range: 789.0 $\pm$ 1003.0 pg/mL) (Mann-Whitney test, $p < 0.01$).

Within the SCD genotypes, we observed twice as high values in the homozygous for Hb S (1113.0 $\pm$ 73.6 pg/mL), in relation to Hb S β -thal (499.0 $\pm$ 138.1 pg/mL) and Hb SC (525.0 $\pm$ $p < 0.01$) groups (t -test, $p < 0.01$). We also found higher average values for the Hb SD group (957.5 $\pm$ 98.8 pg/mL), comparing with Hb SC individuals (ANOVA, $p < 0.01$) (Fig. 1A).

A similar pattern was observed for platelets (Fig. 1B), WBC (Fig. 1C) and neutrophils (Fig. 1D), where the highest values were

Table 3

Genotypic and allelic frequencies for the –509C/T polymorphism in TGFB1 gene.

Groups	CC		CT		TT		p	C		T		p
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	
Control	20	34.5	30	51.7	8	13.8	0.11	70	0.6	46	0.4	0.05
Case	59	51.3	45	39.1	11	9.6		163	0.7	67	0.3	
Hb SS	31	46.3	31	46.3	5	7.4	0.05	93	0.7	41	0.3	0.06
Hb SD	3	37.5	2	25.0	3	37.5		8	0.5	8	0.5	
Hb S β -thal	8	80.0	2	20.0	0	0.0		18	0.9	2	0.1	
Hb SC	17	56.7	10	33.3	3	10.0		44	0.7	16	0.3	

Case group: includes the four SCD genotypes. Statistical analyzes: chi-square and Fisher's exact tests. Significance level: $p < 0.05$.

Table 4
Plasma levels of TGF- β 1 (pg/mL) between the genotypes CC and CT+TT for the –509C/T polymorphism in *TGF β 1* gene.

Groups	CC	N	CT+TT	N	p
Control	457.0 $\pm$ 410.0 ^a	20	313.0 $\pm$ 347.0 ^a	38	0.59 [*]
Case	1250.0 $\pm$ 159.9	59	1049.0 $\pm$ 93.0	56	0.94
Hb SS	1134.0 $\pm$ 99.7	31	1038.0 $\pm$ 91.6	36	0.48
Hb SD	404.0 $\pm$ 28.0	3	1013.0 $\pm$ 273.5	5	0.22
Hb S β -thal	484.3 $\pm$ 163.5	8	550.5 $\pm$ 352.5	2	NP
Hb SC	365.0 $\pm$ 90.3	17	715.4 $\pm$ 185.7	13	0.18

Case group: includes the four SCD genotypes. Data expressed in mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analysis: Student's *t*-test. Significance level: $p < 0.05$. NP: statistical analysis not performed due to the low sample size for one of the groups ($n < 3$).

^a Non-parametric data expressed in median $\pm$ quartile range.

^{*} Corresponds to the *p* value for Mann-Whitney test (nonparametric data).

found for Hb SS group comparing to the levels presented by Hb S β -thal and Hb SC groups (ANOVA, $p < 0.01$).

3.4. Relationship between plasma levels of TGF- β 1 and count of platelets and WBC in SCD

The plasma levels of TGF- β 1 in SCD showed moderate to strong correlation with the amount of platelets in the blood ($r = 0.56$; $p < 0.01$). Moderate correlation was observed in Hb SS group ($r = 0.44$; $p < 0.01$), while there were strong correlations in Hb SD ($r = 0.95$; $p < 0.01$), Hb S β -thal ($r = 0.81$; $p = 0.02$) and Hb SC

($r = 0.70$; $p < 0.01$) groups. Correlations between plasma levels of TGF- β 1 and neutrophils count were not found in the study groups (Table 5).

Correlation analysis between the number of platelets and WBC were also statistically significant in SCD patients. We observed moderate correlation between platelets and WBC ($r = 0.61$; $p < 0.01$) and strong correlation between platelets and neutrophils ($r = 0.76$; $p < 0.01$). On the other hand, the TGF- β 1 was moderately correlated to the WBC ($r = 0.40$; $p < 0.01$), but not to the neutrophils ($r = 0.40$; $p = 0.12$) count. The results of all the correlation analyzes, both for the SCD group and for each genotype, are described in Table 5.

Noticing the association between plasma levels of TGF- β 1 and the count of platelets and WBC in SCD groups, we applied linear regression analysis in order to verify the dependence between these variables. The case group exhibited a moderately significant ratio between TGF- β 1 and platelets ($r^2 = 0.31$, $p < 0.01$) (Fig. 2A). The ratio between these indices was also found in all four genotypes of SCD, and the relation was weak in Hb SS ($r^2 = 0.10$; $p < 0.01$) (Fig. 2B) and Hb SC ($r^2 = 0.28$, $p < 0.01$) genotypes (Fig. 2C), moderate in Hb S β -thal ($r^2 = 0.58$; $p = 0.01$) (Fig. 2D) and strong in Hb SD ($r^2 = 0.75$, $p < 0.01$) (Fig. 2E). The ratio between TGF- β 1 and WBC occurred only in the group with Hb S β -thal and it was moderate ($r^2 = 0.58$, $p < 0.01$).

4. Discussion

We describe here the differences between SCD genotypes based on inference of the inflammatory condition, by the dosage of

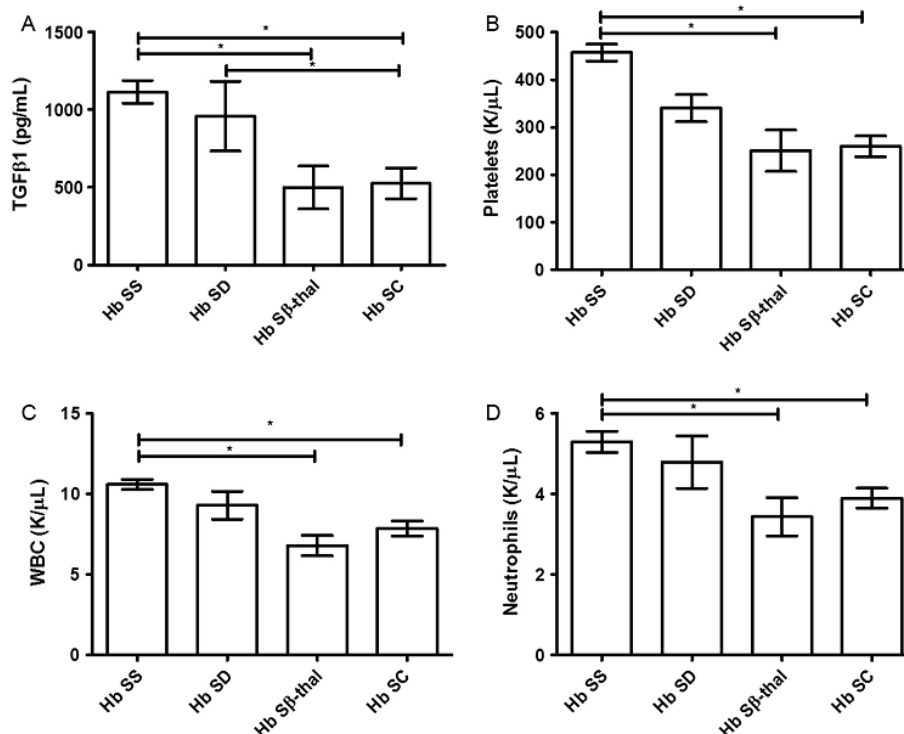


Fig. 1. Influence of SCD genotypes on circulating values of: (A) TGF- β 1, (B) Platelets, (C) WBC (white blood cells), (D) Neutrophils. Higher values for all markers were found in Hb SS and Hb SD groups. Reference values: WBC (5.0–10.0 K/ μ L); neutrophils (1.8–5.0 K/ μ L); platelets (140.0–400.0 K/ μ L). *: Indicates statistically significant difference (one-way Anova and post hoc Tukey-Kramer; $p < 0.01$). Non-parametric data were transformed in log10 prior to perform the statistical analysis.

Table 5Correlations between the circulating levels of TGF- β 1, platelets, total WBC and neutrophils in SCD groups.

Comparisons	Case n = 115		Hb SS n = 67		Hb SD n = 08		Hb Sp-thal n = 10		Hb SC n = 30	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
TGF- β 1 $\times$ Platelets	0.56	<0.01	0.44	0.01	0.95	<0.01	0.81	0.02	0.70	<0.01
TGF- β 1 $\times$ Total WBC	0.40	<0.01	0.18	0.14	0.26	0.54	0.76	0.01	0.18	0.33
TGF- β 1 $\times$ Neutrophils	0.12	0.23	0.11	0.40	0.43	0.30	0.27	0.50	0.13	0.50
Platelets $\times$ Total WBC	0.61	<0.01	0.35	<0.01	0.43	0.30	0.65	0.04	0.47	0.01
Platelets $\times$ Neutrophils	0.76	<0.01	0.42	<0.01	0.57	0.15	0.29	0.41	0.17	0.37
Total WBC $\times$ Neutrophils	0.79	<0.01	0.80	<0.01	0.93	<0.01	0.73	0.02	0.83	<0.01

Case group: includes the four SCD genotypes. Statistical analysis: Pearson correlation. Significance level: $p < 0.05$. Correlation strength: $r < 0.30$ (weak); r entre 0.30 and 0.70 (moderate); $r > 0.70$ (strong).

TGF- β 1 linked to WBC, neutrophils and platelets counts. The evaluated study groups were the four most common genotypes of SCD: Hb SS, Hb SD, Hb Sp-thal and Hb SC. A control group with Hb AA was used as reference for TGF- β 1 dosages and for the effect of -509C/T polymorphism in circulating protein levels.

Although the literature presents studies related to the inflammatory process in sickle cell anemia, this is the first study to consider the four most common genotypes of SCD. Moreover, this is the first association in SCD between plasma levels of TGF- β 1 and the main polymorphism involved in the modulation of the *TGF β 1* gene transcription.

In this study, plasma levels of TGF- β 1 were higher in SCD when compared to the control group without hemoglobinopathies. It was also noted that, in general, increased plasma levels of TGF- β 1 was accompanied by WBC count, indicating the presence of an inflammatory response. There is a consensus that SCD courses with chronic inflammatory state characterized by the rise in WBC count and abnormal activation of granulocytes and monocytes [3,5,20–22]. The occurrence of clinical manifestations in SCD, in turn, is also related to the circulating WBC count, which reinforces the role of leukocytes in SCD inflammation and pathophysiology. The leukocytosis is usually accompanied by an increase in circulating levels of proinflammatory cytokines that exacerbate the sickling and the vaso-occlusive severity of the disease [6,21].

Genetic associations with inflammation support the involvement of inflammatory pathways in SCD pathophysiology and may explain the phenotypic heterogeneity of the disease [6]. We investigate the influence of -509C/T genetic polymorphism in plasma concentrations of TGF- β 1 protein in the assessed groups. The polymorphism frequency did not differ between the groups and was similar to the frequencies previously found by our research group and compared to the literature [23].

TGF- β 1 values were not related to T allele presence for the SCD group or the control group, although the influence of the polymorphism in TGF- β 1 quantities has already been observed in other populations and diseases [10,24]. According to Grainger and cols., in a study conducted in European population, the -509C/T polymorphism in the promoter region of the gene is associated with high circulating concentrations of TGF- β 1, due to the change in the consensus binding site of the transcription factor Ying Yang 1 (YY1) [10]. Silverman and cols. evaluated patients with asthma in a case-control study and showed that the T allele increases the YY1 binding by about 30%, and the basal promoter function, also by 30% [24].

As in our study, other authors also found no relationship between circulating levels of TGF- β 1 and genetic polymorphisms in the regulatory region of *TGF β 1* [25]. It is known that the inflammatory pathway is complex and many cytokines present pleiotropic activity, so that innumerable factors may be involved in stimulating or inhibiting the production of various cytokines. Possibly due to this complexity, we could not relate the inheritance of

only one polymorphism in the gene assessed to the current values of the protein encoded by it. Furthermore, the complexity of pathways involved in the SCD pathophysiology and in modulation of its phenotypic expression can influence the measurements carried out and thus, masking the role of genetic polymorphisms in markers values separately studied.

We observed, however, a relation between plasma levels of TGF- β 1 and the count of platelets in blood of people with SCD. In SCD, platelets circulate in an activated state with abnormal aggregation and increased adhesive properties, due to the expression of adhesion molecules. In addition, platelets also produce significant quantities of inflammatory cytokines and can stimulate endothelial activation [26]. Also in this context, platelets play a pivotal role as mediator of inflammatory response and vascular homeostasis, since they might promote and control the recruitment and adhesion of leukocytes and activation of neutrophils during inflammation [27–29].

TGF- β 1 is a normal component of alpha granules in platelets and most of the circulating cytokine is derived from the degranulation of these platelets [30,31]. In our study, correlation was positive, showing that increased amounts of platelets reflect in higher levels of cytokine in all SCD genotypes. Besides, both TGF- β 1 and platelets showed positively related to the count of total WBC, indicating their involvement in the inflammatory process. Since platelets contain high concentrations of TGF- β 1, its count could be used as an indirect measure of the amount of TGF- β 1 released by platelet degranulation, as previously reported by Assoian and Sporn in cultures of aortic smooth muscle cells [32] and recently demonstrated by Engels and cols in plasma from patients with liver cancer and a control group without the disease [33]. According to the results of this study, we suggest that this ratio could also be used in the inference of TGF- β 1 levels in SCD.

Although initially identified as a proinflammatory cytokine, due to their neutrophils and macrophages chemoattractant activity, the anti-inflammatory role of TGF- β 1 has been gaining prominence [9]. In response to tissue damage caused by inflammation, TGF- β 1 appears to be released by platelets and also by endothelial cells and fibroblasts, maintaining homeostasis and preventing excessive proliferation of immune cells, thus contributing to the resolution of inflammation [8].

Besides attracting macrophages and neutrophils to inflammation sites, TGF- β 1 promotes the polarization from types M1 to M2 macrophages and from types N1 to N2 neutrophils. Type 1 macrophages present proinflammatory activity, through the production and release of proinflammatory cytokines, such as interleukins (IL-1 β , IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), whereas M2 macrophages are involved in suppressing immune response, through the production of IL-10 and TGF- β [34]. Similarly, N1 neutrophils have a higher state of activation and, therefore, a proinflammatory phenotype directed by the release of TNF- α and recruitment of T lymphocytes, for example. On the contrary, N2 neutrophils have less inflammatory activity [35].

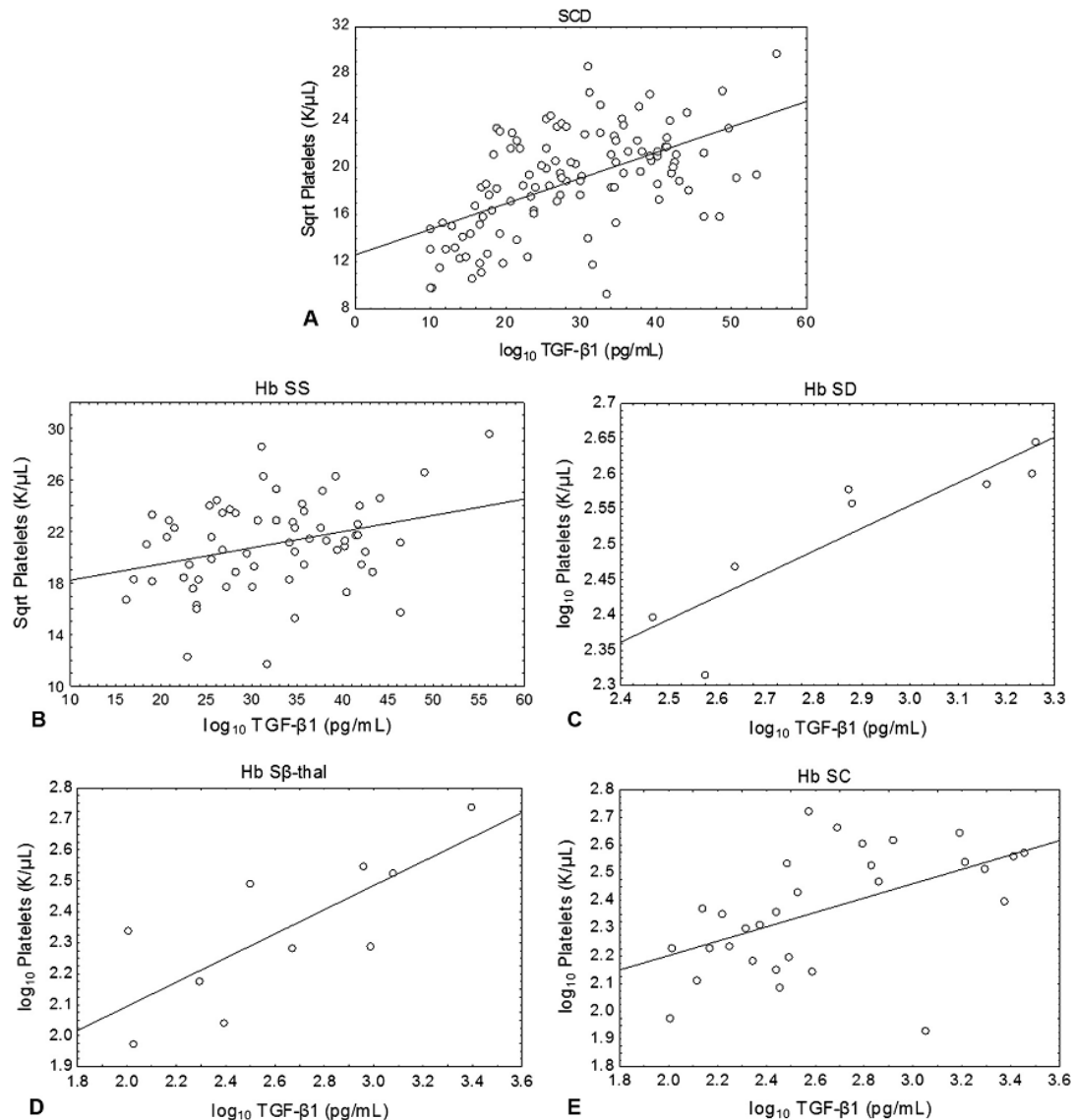


Fig. 2. Simple linear regression analysis between TGF- β 1 plasma levels and platelets count. (A) Weak positive linear regression in case group ($r^2 = 0.31$; $p < 0.01$). (B) Weak positive linear regression in Hb SS ($r^2 = 0.10$; $p = 0.01$). (C) Strong positive linear regression in Hb SD ($r^2 = 0.75$; $p < 0.01$). (D) Moderate positive linear regression in Hb S β -thal ($r^2 = 0.58$; $p < 0.01$). (E) Weak positive linear regression in Hb SC ($r^2 = 0.28$; $p = 0.01$). Sqrt: square root.

Based on this, we believe that because of the chronic inflammatory condition in SCD, the levels of TGF- β 1 are constantly high, especially in cases where the subjects are out of the steady state condition, wherein the hemolytic and vaso-occlusive process is aggravated and culminates in increased inflammatory response.

Among the SCD genotypes, we also found differences in TGF- β 1 values. Although all SCD genotypes presented high TGF- β 1 levels, Hb SS and Hb SD groups showed higher averages than the other groups, suggesting that they are the most clinically severe patients. The existence of phenotypic variation among the different genotypes of the disease is well known, and sickle cell anemia is the

most severe condition, thus following with greater inflammation and release of pro and anti-inflammatory cytokines, compared to other genotypes, especially the Hb SC genotype [1,4]. It is possible that the increased production and release of TGF- β 1 in these patients is occurring in response to the high level of inflammation and that this release is favorable, suppressing the exacerbation of the inflammatory process.

We note that the Hb SD group presented similar behavior to Hb SS genotype in TGF- β 1 dosages and platelets and WBC counts, different from other genotypes. We believe this result is of importance for determining the hemolytic gravity generated by the association

of Hb D with Hb S [36,37]. The mutation for Hb D occurs in the interaction site between Hb S molecules ($\beta 121$ position) and it is believed that the amino acid change (Glu $\rightarrow$ Gln) encourages this interaction and consequently the polymerization process, resulting in erythrocyte sickling [31,32]. Adachi and cols. [36] showed that Hb S polymerization speed is higher when in association with Hb D-Punjab. This may explain the possible inflammatory severity of SCD in double heterozygous Hb SD found in our study.

The immune system regulation by TGF- $\beta 1$ is complex and highly variable, depending on the physiological condition and the types and degrees of differentiation of the cells involved. Because of its multifunctional role and involvement in maintaining tissues homeostasis, clinical applications involving the inhibition or stimulation of the TGF- $\beta 1$ pathway are being investigated, particularly in cases of cancer, fibrosis and autoimmune diseases [8,38].

Among the known effects of TGF- $\beta 1$ in SCD so far in different studies, highlight their involvement in fibrotic processes [39], the inhibition of erythropoiesis [11,40] and inflammatory response [41]. However, in this study, we suggest that its inflammatory role in SCD resides primarily in the maintaining homeostasis, due to its ability to attract and polarize neutrophils and macrophages. Furthermore, the observed relationships between plasma levels of TGF- $\beta 1$ and platelet counts are innovative for DF and reinforce the involvement of TGF- $\beta 1$ in regulating the inflammatory response.

Considering the results obtained in this study, showing the involvement of TGF- $\beta 1$ in SCD inflammation and in view of its action already known to control the immune response, TGF- $\beta 1$ might become an important therapeutic target also in SCD. Mechanisms able to blocking the TGF- β pathway signaling where its action is mainly proinflammatory and/or promoting its action where the anti-inflammatory role is more expressive could be the key for inflammation treatment in SCD. Future studies will address the mechanisms responsible for TGF- $\beta 1$ activation in SCD.

5. Conclusion

In summary, the results presented in this study indicate that the plasma levels of TGF- $\beta 1$ are elevated in SCD, especially sickle cell anemia, the most clinically severe condition. Their levels are related to WBC, evidencing the chronic inflammatory condition triggered by the disease, and associated to the count of circulating platelets, suggesting that increased plasma levels of TGF- $\beta 1$ can be indirectly inferred by increased platelet count in the blood. Because of the strong anti-inflammatory role of the cytokine, the TGF- $\beta 1$ pathway might become an important therapeutic target in the resolution of SCD inflammation. Overall, these data indicate the TGF- $\beta 1$ has an important anti-inflammatory role and represents a potential target for the development of new therapeutic strategies in SCD.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support. Process no. 2012/19653-1. In addition, we thank Gabriel Gandolphi for English text review.

References

- [1] M.H. Steinberg, B.G. Forget, D.R. Higgs, et al., Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2009.
- [2] P.S. Frenette, G.F. Atweh, Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise, *J. Clin. Invest.* 117 (4) (2007) 850–858.
- [3] D.C. Rees, T.N. Williams, M.T. Gladwin, Sickle-cell disease, *Lancet* 376 (9757) (2010) 2018–2031.
- [4] M.H. Steinberg, P. Sebastiani, Genetic modifiers of sickle cell disease, *Am. J. Hematol.* 87 (8) (2012) 795–803.
- [5] R.P. Hebbel, Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 28 (2) (2014) 181–198.
- [6] C.C. Hoppe, Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell anemia, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 28 (2) (2014) 265–286.
- [7] P. Trikha, W.E. Carson 3rd., Signaling pathways involved in MDSC regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1846 (1) (2014) 55–65.
- [8] R.J. Akhurst, A. Hata, Targeting the TGF β signalling pathway in disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (10) (2012) 790–811.
- [9] G. Han, F. Li, T.P. Singh, P. Wolf, et al., The pro-inflammatory role of TGF $\beta 1$: a paradox?, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2) (2012) 228–235.
- [10] D.J. Grainger, K. Heathcote, M. Chiano, et al., Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta 1, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1) (1999) 93–97.
- [11] H. Croizat, R.L. Nagel, Circulating cytokines response and the level of erythropoiesis in sickle cell anemia, *Am. J. Hematol.* 60 (2) (1999) 105–115.
- [12] B. Keikhaei, A.R. Mohseni, R. Norouzirad, Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition, *Eur. Cytokine Netw.* 24 (1) (2013) 45–52.
- [13] M.H. Steinberg, Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia, *Sci. World J.* 9 (2009) 46–67.
- [14] S.K. Ballas, More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data, *Am. J. Hematol.* 87 (3) (2012) 338.
- [15] P. Greer et al., Wintrobe's Clinical Hematology, 13th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2014.
- [16] A.J. Marengo-Rowe, Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate, *J. Clin. Pathol.* 18 (6) (1965) 790–792.
- [17] F. Vella, Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins, *Am. J. Clin. Pathol.* 49 (3) (1968) 440–442.
- [18] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Manatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [19] R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, et al., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia, *Science* 230 (4732) (1985) 1350–1354.
- [20] G.J. Kato, R.P. Hebbel, M.H. Steinberg, et al., Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions, *Am. J. Hematol.* 84 (9) (2009) 618–625.
- [21] M.H. Qari, U. Dier, S.A. Mousa, Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 18 (2) (2012) 195–200.
- [22] E.J. van Beers, Y. Yang, N. Raghavachari, et al., Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease, *Circ. Res.* 116 (2) (2015) 298–306.
- [23] L.S. Torres, E. Belini-Júnior, D.G.H. Silva, C.L.C. Lobo, et al., Frequencies of -308G/A (TNFA) and -509C/T (TGFB1) polymorphisms in sickle cell anemia patients from Brazil, *Genet. Mol. Res.* 12 (4) (2013) 6762–6766.
- [24] E.S. Silverman, L.J. Palmer, V. Subramaniam, Transforming growth factor- $\beta 1$ promoter polymorphism C-509T is associated with asma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169 (2) (2004) 214–219.
- [25] E. Rodríguez-Rodríguez, P. Sánchez-Juan, I. Mateo, et al., Serum levels and genetic variation of TGF- $\beta 1$ are not associated with Alzheimer's disease, *Acta Neurol. Scand.* 116 (6) (2007) 409–412.
- [26] R. Proença-Ferreira, A.F. Brugnerotto, V.T. Garrido, Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients, *PLoS ONE* 9 (2) (2014) e89012.
- [27] G. Ed Rainger, M. Chimen, M.J. Harisson, C.M. Yates, et al., The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease, *Platelets* 26 (6) (2015) 507–520.
- [28] K.A. Müller, M. Chatterjee, D. Rath, T. Geisler, Platelets, inflammation and anti-inflammatory effects of antiplatelet drugs in ACS and CAD, *Throm. Haemost.* 114 (4) (2015).
- [29] F.W. Lam, K.V. Vijayan, R.E. Rumbaut, Platelets and their interactions with other immune cells, *Compr. Physiol.* 5 (3) (2015) 1265–1280.
- [30] A. Meyer, W. Wang, J. Qu, et al., Platelet TGF- $\beta 1$ contributions to plasma TGF- $\beta 1$, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload, *Blood* 119 (4) (2012) 1064–1074.
- [31] S. Redondo, J. Navarro-Dorado, M. Ramajo, The complex regulation of TGF- β in cardiovascular disease, *Vasc. Health Risk Manage.* 8 (2012) 533–539.
- [32] R.K. Assoian, M.B. Sporn, Type β transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells, *J. Cell. Biol.* 102 (4) (1986) 1217–1223.
- [33] E.A. Engels, L. Jennings, T.J. Kemp, et al., Circulating TGF- $\beta 1$ and VEGF and risk of cancer among liver transplant recipients, *Cancer Med.* 4 (8) (2015) 1252–1257.
- [34] I. Striz, E. Brabcova, L. Kolesar, et al., Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy, *Clin. Sci.* 126 (9) (2014) 593–612.
- [35] R.V. Sionov, Z.G. Fridlender, Z. Granot, The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment, *Cancer Microenviron.* 8 (3) (2015) 125–158.
- [36] K. Adachi, J. Kim, S. Ballas, et al., Facilitation of Hb S polymerization by the substitution of Glu for Gln at $\beta 121$, *J. Biol. Chem.* 263 (12) (1988) 5607–5610.

- [37] L.S. Torres, J.V. Okumura, D.G.H. Silva, C.R. Bonini-Domingos, Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 37 (2) (2015) 120–126.
- [38] L.J.A.C. Hawinkels, P.T. Dijke, Exploring anti-TGF- β therapies in cancer and fibrosis, *Growth Factors* 29 (4) (2011) 140–152.
- [39] G.A. Lutty, C. Merges, S. Crone, S. McLeod, Immunohistochemical insights into sickle cell retinopathy, *Curr. Eye Res.* 13 (2) (1994) 125–138.
- [40] R.M. Böhrer, Cutting edge communication, Reactivation of fetal hemoglobin in adult stem cell erythropoiesis by transforming growth factor- β , *J. Hematother. Stem Cell Res.* 12 (5) (2003) 499–504.
- [41] J.J. Letterio, A.B. Roberts, Regulation of immune responses by TGF- β , *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 137–161.

APÊNDICE F – Artigo científico submetido à *Hematology* (ISSN: 1024-5332)

Comprovante de Submissão



Lidiane Torres <lidianebio18@gmail.com>

Submission to Hematology

Editorial Office, Hematology <em@editorialmanager.com>

30 de janeiro de 2016 15:28

Responder a: "Editorial Office, Hematology" <a.c.newland@qmul.ac.uk>

Para: Lidiane Souza Torres <lidiane.unesp@gmail.com>

CC: jessika_okumura@hotmail.com, belini.jnr@gmail.com, renan.bioibilce@gmail.com,
ppnascimento.unesp@gmail.com, dangrunig@gmail.com, clarisse.lobo@hemorio.rj.gov.br,
smoliani@ibilce.unesp.br, claudiabonini@sjrp.unesp.br

Dear Miss Torres

We acknowledge receipt of your submission entitled "Phenotypic diversity of the sickle cell disease in double heterozygous SD-Punjab" to Hematology.

You will be able to check the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author at the URL

<http://hem.edmgr.com/>:

Your username is: lidianetorres

Your password is: available at this link http://hem.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Lidiane&lastname=Torres&email_address=lidiane.unesp@gmail.com

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Hematology

As an author publishing in a Maney journal, we would like to contact you occasionally and keep you up-to-date on products and events related to your area of research. If you do not wish to receive these emails, please email marketing@maneypublishing.com with the subject line 'UNSUBSCRIBE' and the name of the journal.

Hematology

Phenotypic diversity of the sickle cell disease in double heterozygous SD-Punjab

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Phenotypic diversity of the sickle cell disease in double heterozygous SD-Punjab	
Article Type:	Rapid Communication	
Keywords:	Sickle cell disease; Hemoglobinopathy; Hemolytic anemia; Haplotypes; Bantu.	
Corresponding Author:	Lidiane Souza Torres Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho São José do Rio Preto, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Lidiane Souza Torres	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Lidiane Souza Torres Jéssika Viviani Okumura Edis Belini-Júnior Renan Garcia Oliveira Patrícia Pereira Nascimento Danilo G H Silva Clarisse L C Lobo Sonia Maria Olini Claudia Regina Bonini-Domingos	
Order of Authors Secondary Information:		
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL	
Abstract:	Objective: Investigate the phenotypic heterogeneity of the sickle cell disease (SCD) in carriers of hemoglobins S and D-Punjab association (Hb SD) and Bantu haplotype. Methods: We evaluated medical records from 12 patients with SCD whose Hb SD genotype and Bantu haplotype were both confirmed by molecular analysis (PCR-RFLP). Hb S and Hb D levels were quantified by chromatographic analysis (HPLC). Results: Mean concentrations of Hb S and Hb D were $44.8 \pm 2.3\%$ and $43.3 \pm 1.8\%$, respectively. Painful crisis were present in eight (66.7%) patients evaluated, representing the most common clinical event. Acute chest syndrome was the second most prevalent manifestation, occurring in two individuals (16.7%). Three patients were asymptomatic while two others exhibited greater diversity of severe clinical manifestations. Discussion: Generally, the clinical information reported in the medical records showed a great clinical diversity for the SCD, from the absence of symptoms to the wide variety of phenotypes. The SCD genotype, Bantu haplotype and hemoglobin levels not influenced in the clinical diversity. Thus, the phenotypic variation in SCD is present within a specific genotype for disease regardless of the beta-globin gene cluster haplotypes.	
Funding Information:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2012/19653-1)	Miss Lidiane Souza Torres

Title page

Title: Phenotypic diversity of the sickle cell disease in double heterozygous SD-Punjab

Running title: Phenotypic diversity in sickle cell disease

Authors:

1. **Lidiane Souza Torres**¹ (lidiane.unesp@gmail.com) – Corresponding author
2. **Jéssika Viviani Okumura**¹ (jessika_okumura@hotmail.com)
3. **Édis Belini-Júnior**¹ (belini.jnr@gmail.com)
4. **Renan Garcia Oliveira**¹ (renan.bioibilce@gmail.com)
5. **Patrícia Pereira Nascimento**¹ (ppnascimento.unesp@gmail.com)
6. **Danilo Grünig Humberto Silva**¹ (dangrunig@gmail.com)
7. **Clarisse Lopes Castro Lobo**² (diretoria@hemorio.rj.gov.br)
8. **Sonia Maria Oliani**³ (smoliani@ibilce.unesp.br)
9. **Claudia Regina Bonini-Domingos**¹ (claudiabonini@sjrp.unesp.br)

Institutional Affiliations

1. UNESP – Universidade Estadual Paulista, Sao Jose do Rio Preto, Brazil.
Laboratory of Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases
Cristovao Colombo, 2265; Sao Jose do Rio Preto – Sao Paulo – Brazil
Postal code: 15054-000
Phone: +55 (17) 3221-2392
Fax: +55 (17) 3221-2390
2. HEMORIO - Institute of Hematology *Arthur de Siqueira Cavalcanti*, Rio de Janeiro, Brazil.
Frei Caneca, 8; Rio de Janeiro – RJ – Brazil
Postal code: 20211-030
Phone: +55 (21) 2332-8620
Fax: +55 (21) 2224-7030
3. UNESP – Universidade Estadual Paulista, Sao Jose do Rio Preto, Brazil.
Immunomorphology Laboratory
Cristovao Colombo, 2265; Sao Jose do Rio Preto – Sao Paulo – Brazil
Postal code: 15054-000
Phone/Fax: +55 (17) 3221-2390

Declaration of Interest

The authors declare they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo) - FAPESP, for financial support (Process number 2012/19653-1).

ABSTRACT

Objective: Investigate the phenotypic heterogeneity of the sickle cell disease (SCD) in carriers of hemoglobins S and D-Punjab association (Hb SD) and Bantu haplotype.

Methods: We evaluated medical records from 12 patients with SCD whose Hb SD genotype and Bantu haplotype were both confirmed by molecular analysis (PCR-RFLP).

Hb S and Hb D levels were quantified by chromatographic analysis (HPLC). **Results:**

Mean concentrations of Hb S and Hb D were $44.8 \pm 2.3\%$ and $43.3 \pm 1.8\%$, respectively.

Painful crisis were present in eight (66.7%) patients evaluated, representing the most common clinical event. Acute chest syndrome was the second

most prevalent manifestation, occurring in two individuals (16.7%). Three patients were

asymptomatic while two others exhibited greater diversity of severe clinical

manifestations. **Discussion:** Generally, the clinical information reported in the medical

records showed a great clinical diversity for the SCD, from the absence of symptoms to the

wide variety of phenotypes. The SCD genotype, Bantu haplotype and hemoglobin levels

not influenced in the clinical diversity. Thus, the phenotypic variation in SCD is present

within a specific genotype for disease regardless of the beta-globin gene cluster

haplotypes.

Keywords: Sickle cell disease; Hemoglobinopathy; Hemolytic anemia; Haplotypes; Bantu.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is a group of hemolytic anemia that includes the sickle cell anemia and the associations between hemoglobin S (Hb S) and thalassemias or others hemoglobin variants, such as Hb C, Hb D and Hb E. Hb S concentration is a determinant factor for the SCD clinical severity, thus double heterozygous genotypes usually, but not always, are less clinically severe than sickle cell anemia (Hb SS)^{1,2}.

SCD phenotypic heterogeneity can be noticeable between and/or into the different genotypes, once individual genetic features and environmental conditions are able to exert influence on pathophysiology of the disease¹. The association between Hb S and Hb D-Los Angeles (Hb SD) often results in mild to moderate symptoms, although severe conditions have been reported³.

The beta-globin gene cluster haplotypes associated with Hb S are potential modulators of the phenotypic expression in SCD, mainly due their relation with fetal hemoglobin (Hb F) levels. There are five typical haplotypes described in association with Hb S inheritance: Benin, Bantu, Senegal, Cameroon, and Saudi-Arabia India, of which Senegal and Saudi-Arabia India confer the highest Hb F concentrations. In Brazil, Bantu and Benin haplotypes are the most frequent. The first usually is associated with lower Hb F levels, while Benin haplotype have intermediated values^{1,5-7}.

In this study, we aimed to verify the phenotypic diversity of SCD presented by carriers of the Hb SD genotype and Bantu haplotype, in a Brazilian population group.

METHODS

We investigated 12 individuals with Hb SD genotype and Bantu haplotype. Peripheral blood sample was collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 5.0% as anticoagulant. We only consider in study the patients without hydroxyurea use history, due to its influence on the clinical presentation of the disease. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee, from Sao Paulo State University (*Universidade Estadual Paulista-UNESP*) in Brazil.

The hemoglobin fractions were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The Hb SD genotype was confirmed by molecular analysis, after DNA extraction by phenol-chloroform method. PCR-RFLP was applied for Hb S and Hb D confirmation. Hb S was identified using the specific primers sense 5'-GGCAGAGCCATCTATTGCTTA-3' and antisense 5'-ACCTTAGGGTTGCCCATAAC-3' and restriction enzyme DdeI (5'-C↓TNAG-3'). For Hb D, the primers used was the sense 5'-TGCCTCTTTGCACCATTCTA-3' and antisense 5'-GACTCCCACATTCCCTTTT-3', with restriction enzyme EcoRI (5'-G↓AATTC-3').

The beta-globin gene cluster haplotypes was screened in all the patients by analysis of polymorphic sites, namely: 5' γ^G -XmnI, γ^G -HindIII, γ^A -HindIII, $\psi\beta$ -HincII, 3' $\psi\beta$ -HincII e 5' β -Hinf I. The technique applied was PCR-RFLP as previously described by Sutton and cols (1989)⁸. The Bantu haplotype was identified by the combination - + - - -, where “-“ means absence and “+” presence for the respective restriction site. Phenotypic and clinical information was obtained from medical records.

RESULTS

From the 12 patients with Hb SD, six were female and six were male, with median age of 26.5 years old (11-43 years). Mean concentrations of Hb S and Hb D were $44.8 \pm 2.3\%$ and $43.3 \pm 1.8\%$, respectively (Table 1). The patients with Hb SD and Bantu haplotype presented great diversity of phenotypes, since the absence of clinical symptoms until the presence of multiple events associated.

Recurrent painful crisis were the most common clinical event in these patients. They were present in eight (66.7%) individuals, followed by acute chest syndrome (ACS) in two (16.7%) patients. Three patients were asymptomatic and four showed sporadic episodes of pain. Two individuals presented more severe clinical manifestations characterized by ACS episodes. Lastly, two patients exhibited greater diversity of clinical manifestations reported in the medical records. The first was a man 36 years old, with recurrent painful crises, history of several episodes of priapism and persistent leg ulcer. The second was a woman 43 years old, presenting recurrent painful crises, avascular necrosis of the femoral head, born infarction in humerus and iliac aortic dissection, associated to aneurism and convulsive crises (Table 2).

Table 1. Characteristics of Hb SD genotypes and Bantu haplotype carriers.

Characteristics	Hb SD Bantu
Age [years; (mean $\pm$ SD)	25.7 $\pm$ 12.4
Gender [n (%)]	
Female	6 (50.0%)
Male	6 (50.0%)
Hb profile [%; (mean $\pm$ SD)	
Hb A ₂	2.8 $\pm$ 0.4
Hb F	5.1 $\pm$ 3.0
Hb S	44.8 $\pm$ 2.3
Hb D	43.3 $\pm$ 1.8

Table 2. Clinical phenotypes observed in individuals with Hb SD genotype and Bantu haplotype.

Code	Age (years)	Gender	Hb F (%)	Painful crisis	ACS	Leg ulcer	Priapism	Avascular necrosis
SD01	36	F	2.9	X*	X	-	NA	-
SD03	39	F	4.5	X	-	-	NA	-
SD04	13	M	4.0	X	-	-	-	-
SD05	11	F	5.7	-	-	-	NA	-
SD06	25	F	9.3	X	-	-	NA	-
SD07	43	F	4.3	X*	-	-	NA	X
SD08	14	M	4.0	-	X*	-	-	-
SD09	28	F	1.5	X	-	-	NA	-
SD10	12	M	6.4	-	-	-	-	-
SD11	38	M	0.6	-	-	-	-	-
SD12	13	M	11.2	X	-	-	-	-
SD14	36	M	6.4	X	-	X	X	-

ACS: acute chest syndrome. F: female. M: male. X: indicates phenotype presence. X*: indicates phenotype recurrence and presence. For painful crisis, more than three episodes for year was considerate recurrence. For ACS, more than one event was considerate recurrence. -: indicates phenotype absence. NA: not applicable.

DISCUSSION

The screening of clinical occurrences in the medical records from Hb SD genotype carriers showed wide variety of manifestations in SCD. In this study we fixed specific genotype for SCD, beta-globin gene cluster haplotypes and the absence of hydroxyurea treatment as profile for our population. Despite this attempt to compose a homogeneous study group it was still possible to observe great diversity of SCD phenotypes. In addition to these variables, the hemoglobin profile was similar between the individuals, without any considerable variation in mean values for Hb S and Hb F.

As noted in Table 2, the patients SD05, SD10, and SD11 were asymptomatic with two of them representing the younger patients (11 and 12 years old) in this study. It is possible that the young age contribute for the absence of clinical manifestation in these patients. However, patient SD11 is 38 years old and remains without considerable symptoms for the SCD. Moreover, patient SD12 is 13 years old and already courses with sporadic pain. The Bantu haplotype is associated with lower Hb F levels and greater clinical severity for SCD; however in this study we found both asymptomatic individuals and patients with severe symptoms with this haplotype.

We believe that the phenotypic variations frequently found in SCD are beyond disease genotype, beta-globin gene cluster haplotypes or Hb F levels. Although these features significantly contribute to modulate the phenotypic expression of SCD, many other genetic factors may be involved and need to be considered in future studies. In this study, we verified that the Hb SD genotype is associated with a wide clinical variable, from the absence of symptoms till phenotypes with similarity to sickle cell anemia severity. Same results were described by Patel and cols⁴.

CONCLUSION

The phenotypic variation in SCD can be observed within a particular genotype for disease and also in the same beta-globin gene cluster haplotypes. Genetics and environmental characteristics and treatment adherence may also have influence in clinical manifestations of SCD.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo) - FAPESP, for financial support (process number 2012/19653-1).

REFERENCES

1. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal* 2009;18:46-67.
2. Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85(1):6-13.
3. Oberoi S, Das R, Trehan A, Ahluwaia J, Bansal D, Malhotra P, et al. Hb SD-Punjab: clinical and hematological profile of a rare hemoglobinopathy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014;36(3):140-4.
4. Patel S, Purohit P, Mashon RS, Dehury S, Meher S, Sahoo S, et al. The effect of hydroxyurea on compound heterozygotes for sickle cell-hemoglobin D-Punjab: a single centre experience in eastern India. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(8):1341-6.
5. Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quart J Biol Med.* 1984;2(2):53-62.
6. Powars DR. β S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991;5(3):475-93.
7. Powars D, Hiti A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child.* 1993;147(11):1197–202.
8. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol.* 1989;32(1):66-9.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética – CEP Hemorio

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 04 de junho de 2009.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

O projeto, *“Estudo de Polimorfismos Genéticos em Pacientes portadores de Doença Falciforme e sua associação com complicações clínicas”*, registro CEP HEMORIO 151/08, foi **aprovado** pelo Comitê desta Instituição, conforme a Resolução CNS 196, de 10/outubro de 1996, após análise das respostas às pendências.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até 04/12/2009 e ao término do estudo.

Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Laura Jane ou Thais Oliveira) pelo telefone 2299-9442, ramal 2141, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

Laura Jane Gonçalves Neumann
Coordenadora do CEP HEMORIO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Frei Caneca, 8 – Centro – Rio de Janeiro – CEP 20211-030
Tel.: (21) 2299-9442 R. 2215 – Fax: 2242-4250 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO B – Parecer do comitê de ética – CEP UNESP/IBILCE

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos genéticos e expressão de marcadores envolvidos em processos inflamatórios, angiogênicos e de hipóxia na doença falciforme

Pesquisador: Lidiane de Souza Torres

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 08813112.7.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 189.409

Data da Relatoria: 12/11/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto contém todos os itens formalmente previstos: introdução, justificativas, objetivos, material e métodos - com um sub-ítem sobre considerações éticas - e referências bibliográficas. Serão realizadas análises genotípicas em amostras de sangue periférico de 400 pacientes portadores de genótipos menos comuns da anemia falciforme os quais serão correlacionados com a expressão de marcadores da resposta inflamatória, angiogênese e hipóxia.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa ampliar o conhecimento sobre a modulação fenotípica de genótipos menos conhecidos da anemia falciforme, a saber Hb SS, Hb S/beta-talassemia, Hb SC e Hb D com relação às possíveis influências sobre a inflamação, angiogênese e hipóxia tecidual em seus portadores. Para isso os pacientes serão genotipados com base nos genótipos acima. Então, serão avaliados quanto a presença de polimorfismos genéticos para vários reguladores da resposta inflamatória (TNF-alfa, TGF- β , IL-1 β e IL-8) e da angiogênese (VEGF) e para a expressão plasmática desses e de outros reguladores anti-inflamatório (ANXA1) e de hipóxia (HIF-1A). Serão utilizados 400 pacientes, de ambos os gêneros, em acompanhamento no Hemocentro do Rio de Janeiro (HEMORIO) e Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcante, com o qual o Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do IBILCE, onde será realizada a pesquisa, possui convênio de colaboração.

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 1897/99999

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2456

Fax: (17)3221-2500

E-mail: soraiafr@ibilce.unesp.br;

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e descritos pela proponente como pequeno edema no local da punção sanguínea. Os benefícios são relevantes pois o estudo poderá trazer novas informações sobre a influência dos genótipos acima mencionados sobre a fisiopatologia da anemia falciforme.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A questão biológica a ser investigada está bem fundamentada e tem grande relevância clínica para a compreensão da influência genética sobre o quadro clínico da doença. A metodologia é pertinente, atual e exequível no tempo proposto. O projeto atende as recomendações éticas para pesquisas com seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento apresenta, em linguagem clara e acessível, os objetivos da pesquisa, os possíveis riscos, que são mínimos, e demais informações necessárias para fundamentar a escolha dos sujeitos de pesquisa quanto a participação no projeto.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é relevante e exequível e atende plenamente os preceitos éticos recomendados. Os possíveis benefícios acima destacados justificam sua execução.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto está apresentado de forma adequada e sem recomendações. A pesquisadora deverá encaminhar os relatórios parciais semestralmente para avaliação do acompanhamento do projeto pelo CEP.