



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Biociências

Mariana Salvarani

**Biomarcadores moleculares relacionados à presença de Acidente
Vascular Encefálico e Síndrome Torácica Aguda em Anemia
Falciforme**

São José do Rio Preto – SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Biociências

Mariana Salvarani

**Biomarcadores moleculares relacionados à presença de Acidente
Vascular Encefálico e Síndrome Torácica Aguda em Anemia
Falciforme**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética, junto ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto – SP.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra, Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto – SP

2017

Salvarani, Mariana.

Biomarcadores moleculares relacionados à presença de acidente vascular encefálico e síndrome torácica aguda em anemia falciforme / Mariana Salvarani. -- São José do Rio Preto, 2017

61 f. : il., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme – Aspectos genéticos. 3. Polimorfismo (Genética) 4. Arteriopatias oclusivas. 5. Enzima conversora da angiotensina. 6. Inativadores de plasminogênio. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 575.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE UNESP -
Câmpus de São José do Rio Preto

Mariana Salvarani

**Biomarcadores moleculares relacionados à presença de Acidente Vascular
Encefálico e Síndrome Torácica Aguda em Anemia Falciforme**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração Genética, junto ao Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto – SP.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudía Regina Bonini Domingos

UNESP – São José do Rio Preto

Orientadora

Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Flavio Augusto Naoum

Academia de Ciência e Tecnologia – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto – SP

22 de fevereiro de 2017

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Sandra e Dirceu, minhas irmãs,
Adriana e Luciana e aos
meus avós (*in memoriam*)**

*I need to live life
Like some people never will
So find me kindness
Find me beauty
Find me truth
When temptation brings me to my knees
And I lay here drained of strength
Show me kindness
Show me beauty
Show me truth*

(Learning to live – Dream Theater)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Sandra e Dirceu, pelo esforço que tornou possível a realização dos meus sonhos, e pelo exemplo que sempre me deram de dedicação e determinação.

Agradeço a Cláudia, minha orientadora, por todas as oportunidades e pela grande contribuição na minha formação.

Agradeço a todos os meus amigos do LHGDH e CEQ, principalmente a Jéssika por toda a ajuda e paciência, Paty, Camila, Gabi, Gisele, Lidi, Larissa, Kexu, e todos os que passaram pelo LHGDH nesses 5 anos, por dividir comigo todo o conhecimento e muitas risadas.

Agradeço aos meus grandes amigos Laura, João e Coxinha pelos anos de parceria, amizade e desespero compartilhado.

Ao meu namorado Renan, por todo apoio e carinho nessa jornada.

E finalmente agradeço ao IBILCE por me acolher nesses 6 anos.

Resumo

A Anemia Falciforme (AF) é caracterizada pela presença da hemoglobina S em homozigose (Hb SS). As pessoas com AF frequentemente apresentam manifestações clínicas relacionadas a processos de vaso-oclusão como o acidente vascular encefálico (AVE) e síndrome torácica aguda (STA). A regulação da vasoconstrição e vasodilatação é um fator importante na modulação destas manifestações clínicas, sendo alvo de estudos. Neste trabalho, os polimorfismos nos genes de duas enzimas – enzima conversora de angiotensina 1 e 2 (ECA1 e ECA2) e o polimorfismo do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, relacionado com a fibrinólise, foram avaliados. O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona atua na manutenção da pressão arterial e do volume sanguíneo por meio do equilíbrio hídrico e eletrolítico e regulação do tônus vascular. A ECA 1 é a principal enzima desse sistema, e cliva a Angiotensina I em Angiotensina II, um potente vasoconstritor. Uma enzima homóloga, a ECA 2, é capaz de clivar a Angiotensina II em Angiotensina 1-7, uma vasodilatadora. Os polimorfismos I/D no gene *ECA1* (rs1799752) e A/G (rs2106809) no gene *ECA2* foram estudados neste trabalho. Além disso, a regulação fibrinolítica também está relacionada às manifestações clínicas na AF. O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) é um regulador da fibrinólise, inibindo os ativadores do plasminogênio e a formação de plasmina, responsável pela degradação do coágulo. O polimorfismo mais estudado no gene *PAI1*, de inserção de uma guanina (4G/5G) (rs1799889) na região promotora do gene, aumenta a atividade de enzima e diminui a ação fibrinolítica. Para verificar se estes polimorfismos estão relacionados à presença das manifestações clínicas, STA e AVE, foram genotipadas 392 pessoas com AF. As amostras foram caracterizadas segundo seu perfil hemoglobínico, e submetidas à extração de DNA, e utilizadas para a detecção dos polimorfismos por PCR-RFLP. As frequências dos polimorfismos foram analisadas em conjunto com as informações de ocorrência das manifestações clínicas, que foram obtidas dos prontuários médicos. O genótipo mais frequente encontrado para o polimorfismo I/D no gene *ECA1* foi o heterozigoto ID (47,2%) e o alelo mais frequente foi o D (57,3%). Para o polimorfismo A/G no gene *ECA2* o genótipo mais frequente foi o homozigoto GG (45,3%) entre as mulheres, e o alelo G foi mais frequente entre homens e mulheres (60% e 65,4%, respectivamente). Para o polimorfismo no gene *PAI1* encontramos maior frequência do genótipo 5G/5G (48%) e do alelo 5G (67,4%). No grupo estudado não há diferença significativa entre as frequências dos polimorfismos. Foi realizada análise de

regressão logística múltipla para verificar se a presença dos polimorfismos estaria relacionada a ocorrência de STA e AVE nesse grupo. Não encontramos diferença estatística significativa para os valores de *Odds Ratio* para a relação entre os polimorfismos e as manifestações clínicas nos modelos de herança dominante e recessivo, indicando que os polimorfismos estudados não estão associados com a presença de STA e AVE no grupo estudado.

Palavras-chave: vaso-oclusão, enzima conversora de angiotensina, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, polimorfismo.

Abstract

Sickle cell anemia (SCA) is characterized by the presence of hemoglobin S in homozygous (Hb SS). People with AF frequently presents clinical manifestations related to vaso-occlusion processes such as stroke and acute chest syndrome (ACS). The regulation of vasoconstriction and vasodilation is an important factor in the modulation of these complications, being the object of many studies. In this work, the polymorphisms in the genes of two enzymes - angiotensin-converting enzyme 1 and 2 (ACE1 and ACE2) - and fibrinolysis-related plasminogen activator inhibitor type 1 polymorphism were evaluated. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System acts in the maintenance of blood pressure and blood volume through fluid and electrolyte balance and vasodilation and vasoconstriction. ACE 1 is the main enzyme in this system, and cleaves Angiotensin I in Angiotensin II, a potent vasoconstrictor. A homologous enzyme, ACE 2, is capable of cleaving Angiotensin II in Angiotensin I-7, a vasodilator. The I/D polymorphisms in the *ACE1* gene (rs1799752) and A/G (rs2106809) in the *ACE2* gene are studied in this paper. In addition, fibrinolytic regulation is also related to clinical complications in SCD. The plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) is a regulator of fibrinolysis, inhibiting plasminogen activators and the formation of plasmin, responsible for clot degradation. The most studied polymorphism in the *PAI1* gene, of insertion of a guanine (4G/5G) in the promoter region of the gene, increases the enzyme activity and decreases the fibrinolytic action. To verify if these polymorphisms are related to the presence of the clinical manifestations, stroke and ACS, we genotyped 392 people with SCA. The samples were characterized according to their hemoglobin profile, subjected to DNA extraction, and used for the detection of polymorphisms by PCR-RFLP. The frequencies of the polymorphisms were analyzed mutually with the occurrence information of the clinical manifestations, which were obtained from the medical records. The most frequent genotype found for the I/D polymorphism in the *ACE1* gene was heterozygous ID (47.2%) and the most frequent allele was D (57.3%). For the A/G polymorphism in the *ACE2* gene, the most common genotype was the G/G homozygote (45.3%) among the women, and the G allele was more frequent between men and women (60% and 65.4%, respectively). For polymorphism in the *PAI1* gene we found a higher frequency of the 5G/5G genotype (48%) and the 5G allele (67.4%). In the studied group there is no significant difference between the frequencies of the polymorphisms. Multiple logistic regression analysis was performed to verify if the presence of polymorphisms would be related to the occurrence of stroke and ACS in this group. There

were no significant statistical difference for *Odds Ratio* values for the relationship between polymorphisms and clinical manifestations in dominant and recessive inheritance models, indicating that the polymorphisms studied are not associated with the presence of ACS and stroke in the studied group.

Key words: Vaso-occlusion, angiotensin-converting enzyme, plasminogen activator inhibitor type 1, polymorphism.

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Doença Falciforme e suas Manifestações Clínicas.....	13
1.2. Polimorfismos envolvidos na vasoconstrição e vasodilatação	16
1.3. Polimorfismos envolvidos na fibrinólise	19
2. Objetivo Geral	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Casuística e considerações éticas	22
3.2. Metodologia.....	22
3.2.1. Caracterização do perfil hemoglobínico	23
3.2.2. Caracterização molecular e confirmação do genótipo Hb SS.....	27
3.2.3. Análise molecular dos polimorfismos genéticos	31
3.2.4. Análise Estatística.....	37
4. Resultados.....	38
5. Discussão.....	43
6. Conclusões.....	45
7. Referências	46
8. Apêndices	49
8.1 Apêndice 1 – Artigo Científico.....	49

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

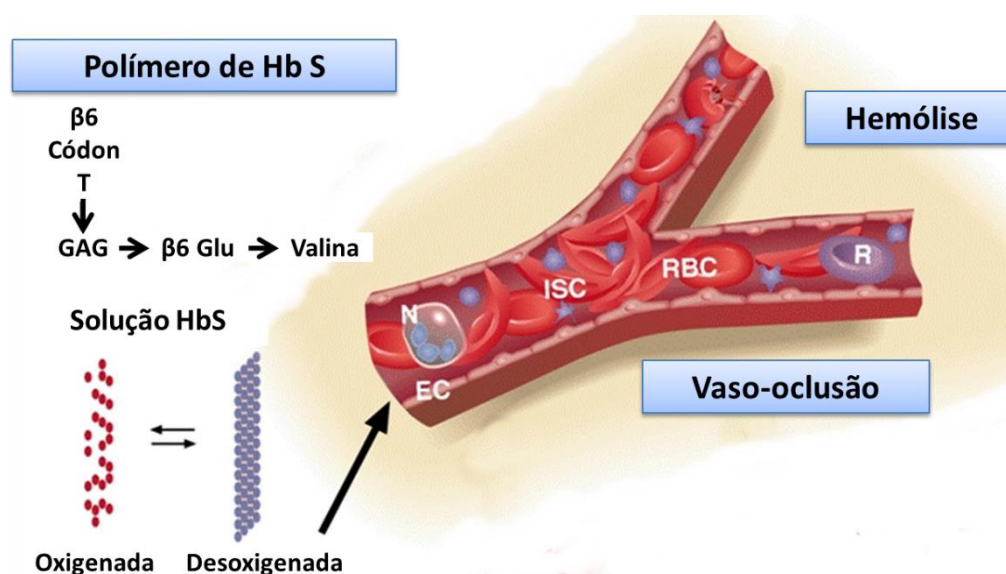
1.1. Doença Falciforme e suas Manifestações Clínicas

Doença Falciforme (DF) é uma condição clínica caracterizada pela presença da hemoglobina S (Hb S), a qual pode estar em interação com outras Hb variantes ou talassemias, e ainda apresentar-se em homozigose caracterizando a Anemia Falciforme (AF). A Hb S é causada por uma mutação pontual no gene da beta globina (*HBB*) levando a troca de um nucleotídeo no gene, uma timina por uma adenina ($G\underline{T}G \rightarrow G\underline{A}G$), resultando na substituição do sexto aminoácido da cadeia globínica, um ácido glutâmico por uma valina (*HBB*^{Glu6Val}) (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Na microcirculação, em condições de baixa tensão de oxigênio ou acidose, a molécula de Hb S desoxigenada tende a formar polímeros nos eritrócitos proporcionando à célula o formato de foice. O polímero formado diminui a maleabilidade do eritrócito e sua capacidade circulatória, podendo causar obstrução vascular. A polimerização pode ser reversível, no entanto os ciclos de polimerização e despolimerização causam danos severos na membrana e citoesqueleto do eritrócito, levando a hemólise. Estes processos promovem as principais manifestações clínicas da anemia falciforme, com vaso-oclusão e anemia hemolítica crônica (Figura 1) (CHIANG; FRENETTE, 2005; STEINBERG, 2008; ZAGO; PINTO, 2007).

A vaso-oclusão é um processo complexo, resultado da interação entre diversas células e o endotélio vascular, como os eritrócitos falcizados, leucócitos e plaquetas (CHIANG; FRENETTE, 2005). Além disso a vaso-oclusão está relacionada a hemólise, pois o rompimento dos eritrócitos e liberação do conteúdo intracelular, entre outras consequências, provoca a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), que reage rapidamente com a hemoglobina livre. Entre as principais funções do NO estão o relaxamento do músculo liso causando a vasodilatação, inibição da ativação das plaquetas e a repressão da transcrição de moléculas de adesão. A redução da sua biodisponibilidade está relacionada a diminuição da vasodilatação e ativação do endotélio, o que favorece a adesão das células ao endotélio e a obstrução do vaso (STEINBERG, 2008). Neste processo há a obstrução da circulação (isquemia) seguida da restauração do fluxo sanguíneo (reperfusão). Na primeira fase, de isquemia, a interrupção do fornecimento de oxigênio causa danos aos

tecidos, e quando o fluxo sanguíneo é reestabelecido, ocorre a reperfusão, com o início de um processo inflamatório (HEBBEL, 2014). Este processo cíclico de isquemia e reperfusão leva a liberação de agentes inflamatórios que aumentam a interação entre o endotélio e as células e, portanto, favorece ainda mais a vaso-oclusão (GLADWIN; VICHINSKY, 2008; HEBBEL, 2014). A vaso-oclusão pode levar a algumas manifestações clínicas características em pessoas com DF, dentre elas o acidente vascular encefálico (AVE) e a síndrome torácica aguda (STA) (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Figura 1: Representação da fisiopatologia da anemia falciforme: da mutação aos processos de hemólise e vaso-oclusão. A mutação no sexto códon do gene da beta globina leva a troca de um aminoácido na cadeia globinica, de um ácido glutâmico para uma valina, originando a hemoglobina S (Hb S). Em condições de desoxigenação a Hb S tende a formar polímeros dentro dos eritrócitos, causando as principais alterações fisiopatológicas da AF, hemólise e vaso-oclusão. Fonte: adaptado de STEINBERG, 2008.

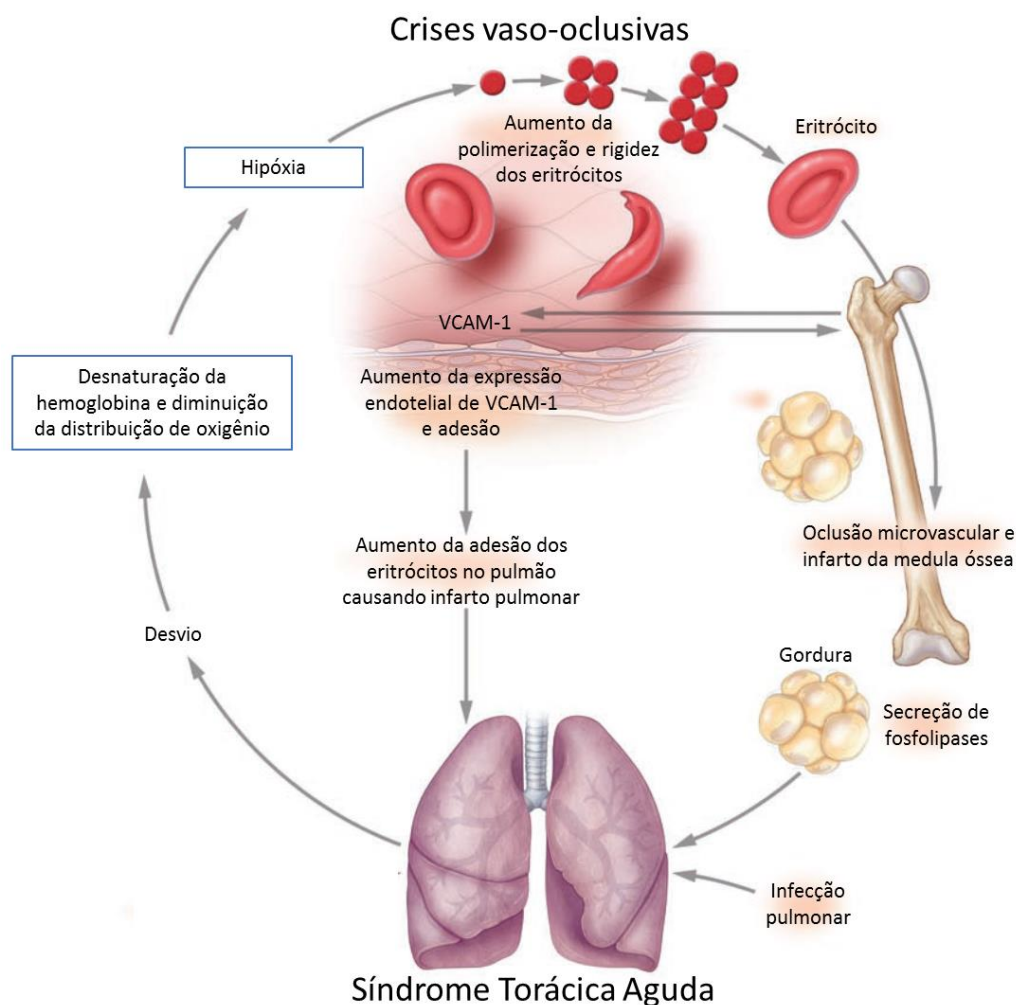


Síndrome Torácica Aguda

A síndrome torácica aguda (STA) é a causa mais comum de morte em pessoas com AF (GLADWIN; VICHINSKY, 2008). É um evento agudo, de lesão pulmonar, caracterizado por febre e sintomas respiratórios contribuindo para morbidade ou pode evoluir rapidamente para falência respiratória aguda. As causas da STA incluem infecções pulmonares (virais ou bacterianas), embolia gordurosa e oclusão microvascular (Figura 2).

Duas destas causas estão associadas a crises vaso-oclusivas: embolia gordurosa pois com a necrose da medula óssea causada por vaso-oclusão, seus componentes, incluindo a gordura, são liberados no sangue podendo viajar pela corrente sanguínea até os pulmões. A oclusão microvascular ou infarto pulmonar ocorre com a vaso-oclusão diretamente nos pulmões. Com a dificuldade respiratória, a diminuição da saturação do oxigênio arterial aumenta a polimerização da Hb S, com consequente obstrução do fluxo sanguíneo e prejuízo na função pulmonar (BALLAS et al., 2010; GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

Figura 2: Ciclo de ocorrência da síndrome torácica aguda e crises vaso-oclusivas na AF. A vaso-oclusão nos ossos causa o infarto da medula óssea e com a necrose o seu conteúdo, principalmente a gordura, pode ser liberado na corrente sanguínea, chegando até os pulmões. Com a dificuldade respiratória e baixa saturação de oxigênio há maior tendência a polimerização da Hb S, voltando a ocorrer crises vaso oclusivas. VCAM-1: molécula de adesão celular-vascular-1 (do inglês: vascular cell adhesion molecule 1). Fonte: adaptado de GLADWIN; VICHINSKY, 2008



Em 10 a 20% dos casos a ocorrência de STA é precedida por uma crise de dor. É mais comum em crianças do que em adultos, porém em adultos tende a ser mais severa progredindo rapidamente para quadros mais graves e até óbito. A transfusão sanguínea crônica e uso de hidroxiureia são utilizados para evitar a ocorrência de STA e outras manifestações (STEINBERG, 2008).

Acidente Vascular Encefálico

O AVE é uma síndrome neurológica, que ocorre em função da oclusão de vasos ou hemorragia e resulta em sintomas específicos. Na AF, o AVE pode ser classificado em: isquêmico, quando há obstrução de vasos; hemorrágico, quando há hemorragia cerebral e ataques isquêmicos transitórios, caracterizados por episódios rápidos de isquemia e que indicam risco para eventos mais graves. As principais causas são elevação da velocidade do fluxo sanguíneo no cérebro, a adesão dos eritrócitos falcizados ao endotélio, devido a diminuição da biodisponibilidade de NO e liberação de moléculas de adesão. O AVE hemorrágico acomete principalmente adultos a partir dos vinte anos, enquanto o isquêmico ocorre, em sua maioria, em crianças. Desde de 1990, o *Doppler* transcraniano é utilizado para avaliar o risco de ocorrência de AVE em pessoas com AF, indicando assim o tratamento adequado e evitando esta complicação, que causa morbidade e mortalidade em pessoas com AF, principalmente em crianças (BALLAS et al., 2010; WEBB; KWIATKOWSKI, 2013).

1.2. Polimorfismos envolvidos na vasoconstrição e vasodilatação

A regulação da vasoconstrição e vasodilatação é um fator importante na modulação das manifestações clínicas da AF. A ação de duas enzimas que atuam nessa regulação – enzima conversora de angiotensina 1 e 2 (ECA1 e 2) – têm sido estudadas como fatores moduladores dos eventos oclusivos e gravidade da doença.

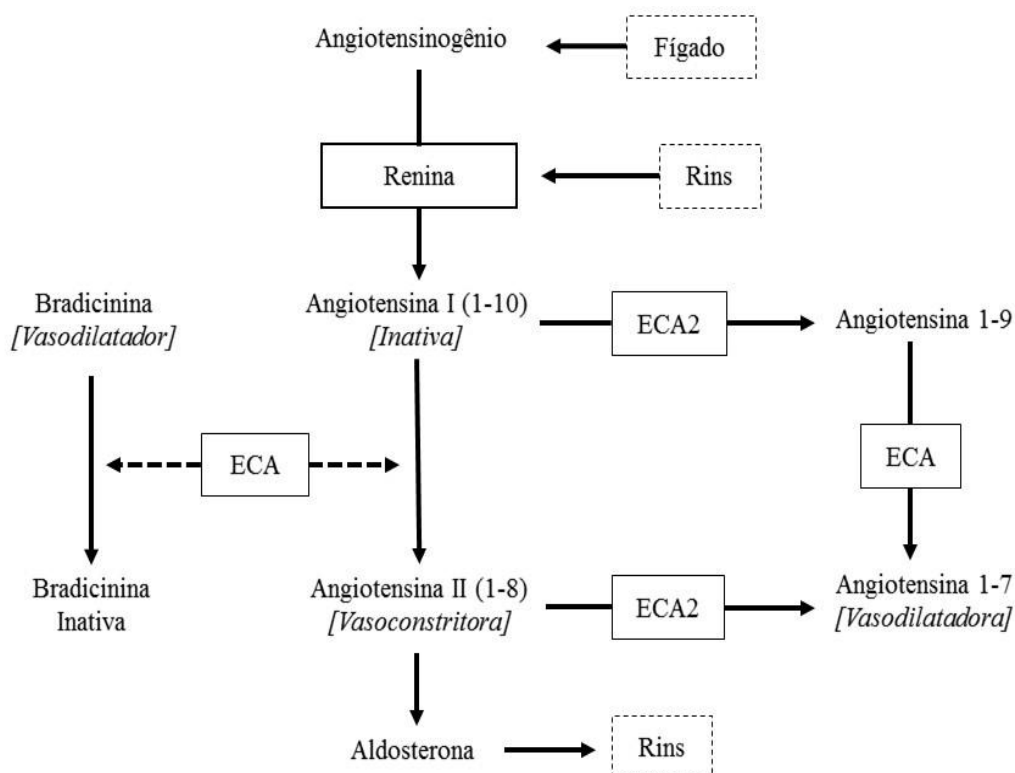
O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é importante na manutenção da homeostase da pressão arterial. Suas ações incluem a regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo por meio do balanço hídrico e eletrolítico e regulação do tônus vascular (HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013). Os principais órgãos envolvidos nesse sistema são os rins; pois nas células renais é produzida a renina que é lançada na circulação, cliva o

angiotensinogênio, uma proteína produzida pelo fígado, formando Angiotensina I (1-10), um decapeptídeo inativo. A Angiotensina I é então clivada pela ECA, que remove dois aminoácidos C-terminais, formando a Angiotensina II (1-8) (BADER; GANTEN, 2008; HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013; RAHIMI; MORADI; NASRI, 2014).

A Angiotensina II (Ang-II) é uma potente proteína vasoconstritora e reguladora do volume sanguíneo, ela se liga aos seus receptores AT_1 e AT_2 que se encontram ligados a proteínas G, sendo o receptor AT_1 o mais importante, e sua ação pode ser observada nas glândulas adrenais, rins e sistema nervoso. No córtex adrenal estimula a liberação de aldosterona que por sua vez estimula os rins a reabsorverem mais água e sódio da urina. Além de clivar a Angiotensina I em Angiotensina II, a ECA1 é capaz de inativar a bradicinina, um vasodilatador, aumentando a ação vasoconstritora por reduzir a liberação de óxido nítrico dependente de bradicinina (HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013; PRASAD et al., 2000; SAYED-TABATABAEI et al., 2006).

Uma enzima homóloga à ECA, a ECA2, é capaz de clivar a Ang-II em Angiotensina (1-7), que tem ação vasodilatadora. A ECA2 pode agir removendo um aminoácido terminal da Ang I (1-10) formando a Angiotensina (1-9), quanto um aminoácido da Ang II (1-8) formando a Angiotensina (1-7), sendo que sua ação é 400x mais na Ang II (BADER; GANTEN, 2008; HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013; VICKERS et al., 2002). A Ang (1-7) exerce sua ação sobre um receptor distinto, o receptor Mas ligado a proteína G, estabelecendo a via alternativa do SRAA, a ECA2-Ang(1-7)-Mas. Essa via tem ação contra regulatória à produção de Ang II pela via clássica da ECA1, regulando a atividade vasoconstritora da Ang II e neutralizando possíveis ações deletérias (MENDOZA; LAZARTIGUES, 2015; SANTOS et al., 2013). A Figura 3 esquematiza a ação da ECA1 e ECA2 no SRAA.

Figura 3: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. O angiotensinogênio liberado pelo fígado é clivado pela renina em angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo inativo. A Ang I pode então ser clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Ang II, com ação vasoconstritora, e esta pode ser clivada pela ECA2 em Ang (1-7), com ação vasodilatadora. A ECA também pode atuar na inativação da bradicinina, o que aumenta sua ação vasoconstritora. Fonte: adaptado de SAYED-TABATABAEI et al., 2006.



Os polimorfismos encontrados nos genes *ECA1* e *ECA2* são amplamente estudados como moduladores da pressão sanguínea e vasoconstrição. O polimorfismo I/D do gene *ECA1* (rs1799752) é um dos mais estudados devido à sua importância clínica. Consiste na inserção (I) ou deleção (D) de uma sequência de 287 pares de bases no íntron 16 do gene *ECA1*, localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q23.3) (SAYED-TABATABAEI et al., 2006). A presença do alelo D está associada ao aumento da transcrição do RNA mensageiro aumentando os níveis plasmáticos da ECA e, conseqüentemente os níveis de Ang II, elevando a ação vasoconstritora (EVANGELISTA et al., 2015). A homozigose do alelo D mostra efeitos deletérios, podendo ser um fator de risco para doenças cardiovasculares, assim como o alelo I pode ter efeito protetor para essas doenças (PRASAD et al., 2000; SIMSEK et al., 2013).

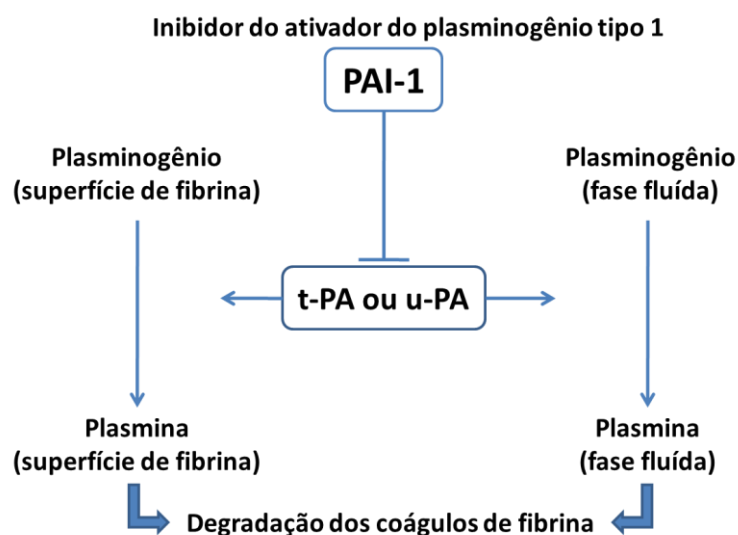
No gene *ECA2*, localizado no cromossomo X, o polimorfismo mais estudado é o de troca de base de uma adenina por uma guanina (A/G), na posição 1075 do íntron I (rs2106809). Seus efeitos não foram completamente compreendidos mas diversos estudos tentaram encontrar associação entre a presença do alelo mutante (G) e doenças cardiovasculares (BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004; LIU et al., 2016; PALMER et al., 2008).

1.3. Polimorfismos envolvidos na fibrinólise

A coagulação sanguínea também está associada às manifestações clínicas da AF como eventos trombóticos. O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) é uma glicoproteína da superfamília das serpinas, com ação inibitória. Ele atua como regulador da via da fibrinólise, inibindo os ativadores do plasminogênio tecidual e uroquinase (tPA e uPA). Essa inibição impede a formação da plasmina, responsável pela degradação da fibrina, pela clivagem do plasminogênio (Figura 4). O PAI-1 é sintetizado e liberado pelas plaquetas e células endoteliais quando estimuladas pela trombina, ao se ligar ao tPA e uPA, o PAI-1 forma um complexo estável que é retirado de circulação pelas células hepáticas. Esse sistema de inibição impede a lise prematura dos coágulos pela plasmina, no entanto, uma diminuição da fibrinólise pode causar maior deposição de fibrina nos vasos (KOHLENER; GRANT, 2000; ZORIO et al., 2008). Estudos mostram que altos níveis plasmáticos de PAI-1 podem estar associados a distúrbios na fibrinólise e eventos trombóticos como doenças cardiovasculares, trombose, derrame e complicações gestacionais (LIMA et al., 2011; MAGDOUD et al., 2013; MORGAN; BOMBELL; MCGUIRE, 2013).

O polimorfismo mais estudado no gene *PAI-1* é o de inserção ou deleção de uma guanina na posição -675 (4G/5G) (rs1799889), na região promotora do gene, localizado no cromossomo 7 (7q22.1). No alelo 5G, a inserção de uma guanina cria um sítio repressor, causando uma menor transcrição do gene em relação ao alelo 4G. O alelo 4G está associado a um nível plasmático mais alto de PAI-1 pois sua atividade de transcrição é maior. A homozigose do alelo 4G está associada a níveis até cinco vezes mais altos de PAI-1, com consequente menor atividade fibrinolítica (MAGDOUD et al., 2013; MORGAN; BOMBELL; MCGUIRE, 2013; ZORIO et al., 2008).

Figura 4: Esquema da inibição da fibrinólise pelo PAI-1. A inibição da fibrinólise ocorre pela ação do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) sobre os ativadores do plasminogênio tecidual e uroquinase (t-PA e u-PA, respectivamente), inibindo a formação da plasmina e a degradação dos coágulos de fibrina. Fonte: adaptado de KOHLER; GRANT, 2000.



Os polimorfismos genéticos que regulam os níveis destas proteínas podem estar associados com a gravidade da AF, uma vez que alteram a resposta individual à doença e ao tratamento. A investigação destes polimorfismos permitirá verificar a sua ação como moduladores das manifestações clínicas em pessoas com AF, e entendimento de como fatores genéticos podem influenciar a fisiopatologia da doença, com o intuito de prover um tratamento individualizado e mais eficiente para essas pessoas. Com isso pretendemos verificar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* e relacionar com a presença de AVE e STA em pessoas com Anemia Falciforme.

2. OBJETIVOS

2. Objetivo Geral

- Verificar se os polimorfismos nos genes *ECA1* (I/D), *ECA2* (A/G) e *PAII* (4G/5G) estão relacionados à presença de AVE e STA em pessoas com Anemia Falciforme (AF).

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar comparativamente a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos nos genes *ECA1* (I/D), *ECA2* (A/G) e *PAII* (4G/5G) em pessoas com AF;
- Verificar se há associação entre a presença dos polimorfismos nos genes *ECA1* (I/D), *ECA2* (A/G) e *PAII* (4G/5G) com a ocorrência de STA e AVE em pessoas com AF.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Casuística e considerações éticas

As amostras utilizadas neste estudo fazem parte de um banco de amostras de pessoas com DF do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, provenientes de amplo estudo colaborativo estabelecido com o Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” - HEMORIO do Rio de Janeiro – RJ, sob o número 000054/33/01/2012. As 392 amostras de pessoas com AF possuem as manifestações clínicas relatadas e obtidas por meio de avaliação dos prontuários clínicos. As análises do polimorfismo de *ECA1* fazem parte do estudo colaborativo, e foram incluídas as análises de *ECA2* e *PAII*. Para isso, novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi solicitado e novo processo foi aprovado sob o número 151/08 no Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO. O TCLE foi obtido dos pacientes com Anemia Falciforme que foram incluídos nesse estudo por pessoal do HEMORIO, responsável pelas coletas e treinados para essa finalidade.

3.2. Metodologia

Foram utilizadas amostras previamente coletadas e caracterizadas segundo seu perfil hemoglobínico pelos testes de triagem realizados no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) – eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino (8,6) e ácido (6,2), resistência globular osmótica em NaCl a 0,36%, análise da morfologia eritrocitária e quantificação das hemoglobinas por HPLC (Ultra² – Trinity Biotech®). As amostras sanguíneas foram submetidas a extração de DNA pela técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol e a confirmação genotípica da Anemia Falciforme foi realizada por PCR-RFLP. O DNA armazenado foi utilizado para a detecção dos polimorfismos genéticos nos genes *ECA2* e *PAII* por PCR.

3.2.1. Caracterização do perfil hemoglobínico

Resistência Globular Osmótica em Cloreto de Sódio a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

Princípio

O teste pode apresentar resultado positivo para portadores de hemoglobinopatias, como heterozigotos para hemoglobina C, para casos de hemoglobina S ou heterozigotos compostos Hb S/C, e para outras anemias como a anemia ferropriva.

Reagentes

1) Solução estoque de NaCl a 10%

NaCl9,0g

Na₂HPO₄1,36g

NaH₂PO₄H₂O0,28g

H₂O q.s.p.100ml

Conservar refrigerado e aquecer a 37°C para preparação da solução trabalho.

2) Solução trabalho a 0,36%

NaCl 10%.....36ml

Água destilada q.s.p.....1000ml

A solução de cloreto de sódio deve ser tamponada, pois o valor do pH influencia no resultado do teste. A solução trabalho deve ser mantida em temperatura ambiente.

Procedimento

Em um tubo de ensaio colocar 2,0mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total. Agitar suavemente por inversão e aguardar 10 minutos para leitura.

Interpretação

Colocar o tubo com a amostra a 2,0 centímetros de uma folha branca com linhas negras. A resistência aumentada à hemólise dos eritrócitos torna a amostra opaca e não se visualiza as linhas negras. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizam-se facilmente as linhas através da solução.

Análise da Morfologia Eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)

No esfregaço sanguíneo analisa-se o tamanho, a forma e a quantidade de hemoglobinas nos eritrócitos e os resultados são divulgados conforme padronizado no LHGDH:

- alterações discretas: (+)
- alterações moderadas: (++)
- alterações acentuadas: (+++)
- células normais: (N)

Os parâmetros observados na análise da morfologia são: anisocitose, aumento da variabilidade do tamanho dos eritrócitos; microcitose, diminuição do tamanho dos eritrócitos; macrocitose, aumento do tamanho dos eritrócitos; hipocromia: redução da coloração (palidez) na área central do eritrócito; e poiquilocitose que é a variação da forma dos eritrócitos e células em “alvo” que têm um ponto de coloração mais densa no meio da área de palidez central.

Hemolisado com Saponina (NAOUM, 1990)

A saponina é um detergente solúvel em água, é indicado para utilização em solução de lise nas suspeitas de hemoglobinas instáveis e talassemias. Por sua simplicidade e rapidez o hemolisado com saponina é utilizado nas triagens para hemoglobinopatias e estudos populacionais.

Reativo Hemolisante

Saponina P. A.1g
Água destilada.....100ml

Procedimento

- Em placa de Kline colocar um volume de sangue com dois volumes de reativo hemolisante.
- Homogeneizar até a hemólise completa da mistura.
- Utilizar o hemolisado após 5 minutos, e no máximo 24 horas depois de sua preparação.

Eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (pH 8,6) (MARENCO-ROWE, 1965)

A substituição de aminoácidos nas cadeias globínicas causa alterações na carga elétrica da molécula de hemoglobina com diferentes padrões eletroforéticos. A técnica é baseada na migração das moléculas quando é aplicado um campo elétrico. O tampão em pH alcalino faz com que as moléculas migrem para o cátodo de acordo com sua eletronegatividade. A Hb S por exemplo tem a substituição de um aminoácido (Glu>Val), que a deixa mais positiva em relação a HbA, isso faz com que ela migre mais lentamente em relação a HbA (WAJCMAN; MORADKHANI, 2011).

Reagente

1- Tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6 (TEB pH 8,6)

Tris-hidroximetil-aminometano.....	10,2g
Ácido etileno-diamino-tetracético.....	0,6g
Ácido bórico.....	3,2g
Água destilada q.s.p.....	1000ml

Procedimento

- Embeber as fitas de acetato de celulose por 15 minutos no mínimo e no máximo 6 horas em tampão TEB pH 8,6
- Utilizar o mesmo tampão para os compartimentos eletrolíticos da cuba.

- Secar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de *Perfex*.
- Aplicar as amostras de solução de hemoglobinas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo.
- Para cada conjunto de amostras em uma fita, aplicar um controle (padrão) na primeira posição, à esquerda.
- Passar 300 volts por 30 minutos.
- Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com Negro de amido ou Ponceau.

Eletroforese de Diferenciação em ágar em pH ácido (pH 6,2) (VELLA, 1968)

A eletroforese em pH ácido é importante para a diferenciação de hemoglobinas que não são possíveis de identificar em pH alcalino. A Hb C, por exemplo, migra em posição semelhante à Hb A₂ em pH alcalino, mas pode ser diferenciada desta em pH ácido. Sendo possível em pH ácido diferenciar as Hb S e HbC de outras hemoglobinas variantes e detectar a HbF com maior precisão.

Reagentes

1-Tampão Fosfato pH 6,2

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

Conservar em geladeira.

2-Gel de Ágar-Fosfato

Ágar-agar 0,5g
 Tampão fosfato pH 6,225mL

Procedimento

- Em um erlenmeyer de 250mL aquecer os componentes do gel de ágar-fosfato até completa dissolução.
- Pipetar 5mL do gel em lâminas de microscópio. Deixar gelificar à temperatura ambiente. As lâminas podem ser conservadas em geladeira, em câmara úmida, por até 5 dias.
- Aplicar as amostras na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel.
- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos usar folha dupla de papel filtro ou *Perfex*.
- Passar 100 volts por 30 minutos.
- Analisar inicialmente sem corar.
- Para melhor interpretação das frações corar com Ponceau ou Negro de amido.

Cromatografia líquida de Alta Performance (Ultra²– Trinity Biotech®)

O teste consiste de cromatografia utilizando uma coluna de troca iônica e uso de um gradiente entre duas fases móveis com diferentes concentrações de sais e pH. A separação das proteínas ocorre de acordo com a carga elétrica e afinidade pela coluna, com tempo específico de retenção. Após o processamento da amostra, o equipamento emite um cromatograma contendo os picos de eluição, os tempos de retenção, e a quantidade de cada fração de hemoglobina detectada em porcentagem.

3.2.2. Caracterização molecular e confirmação do genótipo Hb SS

Extração de DNA por fenol-clorofórmio (OLIVEIRA, 2006)

Reagentes

1- Solução de lise 1 para extração de DNA

Sacarose.....10,95g

Tris HCl 10 mM.....1 mL

MgCl₂ 5 mM.....0,5 mL

Triton 1% 100x.....1 mL

Água ultra pura q. s. p.....100 mL

Dissolver bem e armazenar em geladeira

2- Solução de lise 2 para extração de DNA

NaCl 0,075 M.....2,19g

EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0).....20 mL

Água ultra pura q. s. p.....500 mL

Autoclavar e armazenar em geladeira

3- Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K.....20mg

Água ultra pura q.s.p.....1 mL

Conservar em freezer

4- Clorofórmio/ álcool isoamilico 24:1

Clorofórmio.....24 mL

Álcool isoamilico.....1 mL

Conservar em geladeira

5- SDS 10%

SDS.....10 g

Água ultra pura q. s. p.....100 mL

Não autoclavar e estocar à temperatura ambiente

7- KCl 2M

$$M = \frac{m}{PM(g) \cdot XV(L)}$$

Para KCl de peso molecular 74,55g, usar 14,91g diluídos em 100 mL de água ultra pura autoclavada q.s.p.

Procedimento

- Colocar 800 µL de sangue periférico colhido com EDTA em um tubo e completar o volume para 1,5 mL de solução de lise 1, homogeneizar e centrifugar
- Descartar o sobrenadante deixando aproximadamente 300 µL de pellet
- Completar para 1mL de solução de lise 1, homogeneizar até desfazer o pellet e deixar descansar por 10 – 15 minutos e centrifugar.
- Descartar o sobrenadante e repetir a etapa anterior.
- Acrescentar ao pellet 450 µL de solução de lise 2, homogeneizar e adicionar SDS e proteinase K.
- Incubar em banho-maria a 37° overnight ou 42° por 3 horas.
- Adicionar 500µL de fenol, homogeneizar e centrifugar.
- Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar 500µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, homogeneizar e centrifugar.
- Repetir a etapa anterior
- Transferir o sobrenadante para outro tubo contendo 50µL de KCl gelado e adicionar 500µL de etanol 100% também gelado
- Inverter o tubo até precipitar o DNA e centrifugar
- Desprezar o sobrenadante e lavar o DNA com etanol 70% e centrifugar
- Desprezar o sobrenadante e deixar secar, hidratar com Tris-EDTA ou água ultra pura deixando em temperatura ambiente e depois estocar em geladeira.

Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985)

A detecção da mutação (HBB:c.20A>T – rs334) que altera o sexto códon da proteína (GAG > GTG - GLUβ6VAL) foi realizada por reação em cadeia da polimerase seguida de análise de restrição de polimorfismo único (PCR-RFLP). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação que envolve o sexto códon foram: o P 277 (*sense*): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o P 278 (*antisense*): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'. O protocolo de amplificação está especificado na tabela 1.

Tabela 1. Protocolo de amplificação para a PCR de Hb S

Mix	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O	----	14,0
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,5
dNTP	1,25 mM cada	1,0
Primer P277	10,0 μM	1,5
Primer P278	10,0 μM	1,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μL	0,2
DNA	150 ng/ μL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM : micromolar; μL : microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH adaptado de SAIKI et al., 1985.

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 94°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 55°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições.

Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C por cinco minutos. A enzima utilizada foi a *Dde* I (C↓TNAG). O protocolo de digestão esta especificado na tabela 2.

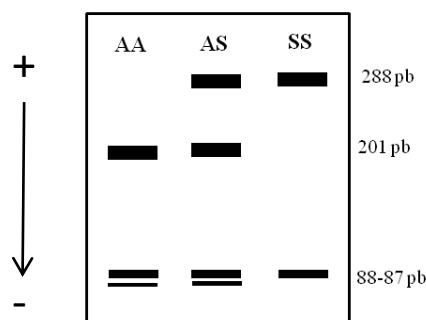
Tabela 2. Protocolo de digestão para a RFLP de Hb S

Mix	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O	----	8,5
Tampão <i>FastDigest</i>	10X	1,0
<i>Dde</i> I	1 FDU/ μL	0,5
PCR	----	5,0
Volume final da reação		15,0

μL : microlitros. Fonte: LHGDH adaptado de SAIKI et al., 1985.

A mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para a enzima *Dde* I; assim após a digestão o alelo normal gerou 3 fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb e o alelo mutante gerou dois, um de 288 pb e outro de 88 pb. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS. AA: homocigoto selvagem; AS: heterocigoto para Hb S; SS: homocigoto para Hb S; pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.



3.2.3. Análise molecular dos polimorfismos genéticos

Enzima Conversora de Angiotensina I (ECAI)

A detecção do polimorfismo de inserção/deleção de 287 pb (rs1799752) no gene *ECAI* (17q23.3) é baseado em duas ampliações com *primers* diferentes. A primeira amplificação utiliza-se o *primer* ECA 1 (sense) 5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3' e ECA 2 (antisense) 5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'. O protocolo da primeira amplificação está especificado na tabela 3.

Tabela 3. Protocolo da primeira amplificação para ECAI por PCR

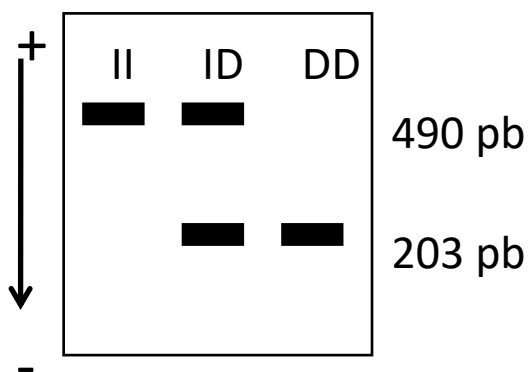
Mix	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O	----	15,3
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5
dNTP	1,25 mM cada	2,5
Primer 1	10,0 μM	0,5
Primer 2	10,0 μM	0,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μL	0,2
DNA	150 ng/ μL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM : micromolar; μL : microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH adaptado de RIGAT et al., 1990.

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 95°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 30 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 58°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 31 ciclos de repetições.

O tamanho do fragmento com a inserção é de 490 pb. Assim, após a amplificação o alelo normal gera um fragmento 490 pb e o alelo mutante gera um fragmento de 203 pb (RIGAT et al., 1990). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática da primeira PCR para ECAI. II: homozigoto para a inserção de 287 pb; ID: heterozigoto para a inserção de 287 pb e DD: homozigoto para a deleção de 287 pb. pb : pares de bases. Fonte: LHGDH.



Nesta primeira amplificação, há uma preferência do alelo com inserção amplificar como deleção. Assim, aquelas amostras homozigotas para a deleção passaram por uma segunda amplificação para a separação do heterozigoto do homozigoto para a deleção. Os *primers* utilizados nesta segunda amplificação são: ECA 3 (sense) 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3' E ECA 4 (antisense) 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA T 3'. O protocolo da segunda amplificação está especificado na tabela 4.

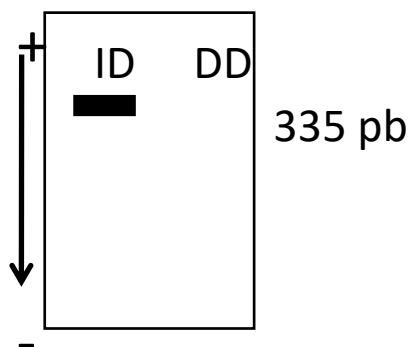
Tabela 4. Protocolo da segunda amplificação para ECAI por PCR

Mix	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O	----	15,8
Tampão sem MgCl ₂	10X	2,5
MgCl ₂	50 mM	1,5
Dntp	1,25 mM cada	2,0
Primer 3	10,0 μM	0,5
Primer 4	10,0 μM	0,5
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μL	0,2
DNA	150 ng/ μL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM : micromolar; μL : microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH adaptado de RIGAT et al., 1990.

A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: 95°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 66°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições. Após a amplificação, o alelo heterozigoto para a inserção apresenta uma banda em 335 pb e o homozigoto para a deleção não amplifica. A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática da segunda PCR para ECAI. ID: heterozigoto para a inserção e DD: homozigoto para a deleção. pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.



Enzima Conversora de Angiotensina II (ECAII)

A detecção do polimorfismo no intron I (1075A>G) do gene da *ECA2* (Xp22) foi avaliado por PCR-RFLP. O par de *primers* utilizados foram: P1 5' TAA CAA GTG CAA GGA TTT AGG 3' e P2 5' AAG CTG CAA TGA ATC ATG AT 3'. O protocolo da amplificação é especificado na tabela 5.

Tabela 5. Protocolo da amplificação para ECAII por PCR

Mix	Concentração	Volume (μ L)
H ₂ O	----	15,8
Tampão com MgCl ₂	10X	2,0
dNTP	1,25 mM cada	2,0
Primer 1	10,0 μ M	2,0
Primer 2	10,0 μ M	2,0
<i>Taq</i> Polimerase	5U/ μ L	0,2
DNA	150 ng/ μ L	1,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μ M: micromolar; μ L: microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH adaptado de BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: 94°C a dez minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 10 repetições de 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 65°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; um ciclo com 15 repetições de 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; um ciclo de 20 repetições a 1 minuto a 94°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 1 minuto a 58°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; um ciclo final a 20 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições.

Após a amplificação, o fragmento de 471 pb foi digerido a 37 °C por cinco minutos pela enzima *AvaII*. O protocolo de digestão é especificado na tabela 6.

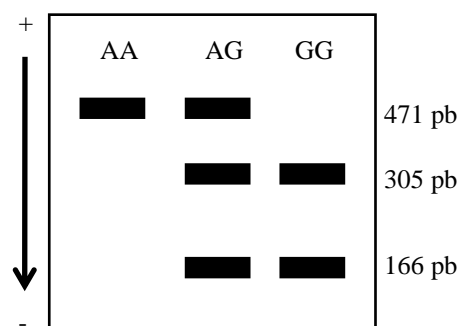
Tabela 6. Protocolo de digestão para a RFLP de ECAII

Mix	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O	----	8,5
Tampão <i>AvaII</i>	10X	1,0
<i>AvaII</i>	1 FDU/ μL	0,5
PCR	----	5,0
Volume final da reação		15,0

μL : microlitros. Fonte: LHGDH adaptado de BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004.

A mutação no intron I (1075A>G) gera um sítio de restrição para a enzima *AvaII* e então, o alelo normal terá um fragmento de 471 pb e o mutante gerará dois fragmentos de 305 pb e 166 pb (BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para ECAII. AA: homozigoto selvagem; AG: heterozigoto para ECAII; GG: homozigoto para ECAII; pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.



Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1 (PAI1)

O polimorfismo de inserção/deleção de 4G/5G (*rs1799889*) na região promotora (-675 pb) do gene *PAI1* (7q22.1) foi avaliado por PCR-RFLP. Os pares de primers utilizados foram: PAI 1 (sense) 5' CAC AGA GAG AGT CTG GCC ACG T 3', PAI 2 (antisense) 5'CCT AGA CAA TCA CGT GGC TG 3'. O protocolo de amplificação é especificado na tabela 7.

Tabela 7. Protocolo de amplificação para a PCR-RFLP de PAI-1

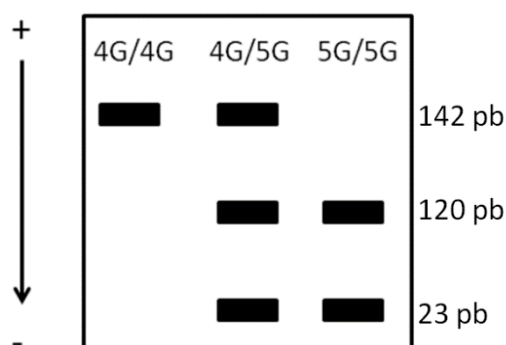
Mix	Concentração	Volume (μL)
H ₂ O	----	14,8
Tampão com MgCl ₂	10X	2,0
dNTP	1,25 mM cada	2,0
Primer CD1	10,0 μM	2,0
Primer CD2	10,0 μM	2,0
TaqPolimerase	5U/ μL	0,2
DNA	150 ng/ μL	2,0
Volume final da reação		25,0

MgCl₂: cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; μM : micromolar; μL : microlitros; ng: nanogramas. Fonte: LHGDH adaptado de BARBER et al., 2008.

A reação de amplificação obedece às seguintes condições: 95°C a cinco minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições de 45 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 45 segundos a 68°C para anelamento dos primers e 45 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém-sintetizados, totalizando 36 ciclos de repetições.

O amplificado de 142 pares de bases foi digerido com a enzima de restrição *BseIIa* 37°C por 5 minutos. A mutação cria o sítio de restrição para a enzima, portanto o indivíduo normal (4G/4G) gera um fragmento (142 pb) e o mutante (5G/5G) gera dois fragmentos (120 e 23 pb) (BARBER et al., 2008). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 4%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para PAI-1. 4G/4G: homozigoto selvagem; 4G/5G: heterozigoto para PAI-1; 5G/5G: homozigoto para PAI-1; pb: pares de bases. Fonte: LHGDH.



3.2.4. Análise Estatística

Foi realizada análise de regressão logística múltipla utilizando o software BioEstat 5.0, para a obtenção dos valores de *Odds Ratio* nos modelos de herança recessivo e dominante e qui-quadrado para a comparação das frequências. Foram considerados significantes os valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4. Resultados

As frequências genótípicas e alélicas encontradas para os polimorfismos nos genes estudados estão expostas na tabela 8. Como o gene *ECA2* está localizado no cromossomo X, são apresentadas as frequências genótípicas e alélicas encontradas entre as mulheres e as frequências alélicas encontradas entre os homens, separadamente.

Foram genotipadas 392 amostras para o polimorfismo I/D no gene *ECA1*, 367 amostras para o polimorfismo no gene *PAII* e 342 amostras para o polimorfismo A/G no gene *ECA2*, sendo 192 mulheres e 150 homens.

Para todos os polimorfismos avaliados, com exceção do polimorfismo da *ECA2*, foi notada uma frequência genotípica e alélica semelhante entre homens e mulheres. O genótipo mais frequente para o polimorfismo no gene *ECA1* foi o heterozigoto I/D (47,2%) e o alelo mais frequente foi o D (57,3%). Para o *ECA2*, o genótipo mais frequente foi o G/G (45,3%) entre as mulheres e o alelo G para homens e mulheres (60% e 65,4%, respectivamente) e para o *PAII*, o genótipo mais frequente foi o 5G/5G (48%) e o alelo 5G (67,4%), apresentando frequência baixa do genótipo 4G/4G (13%). Na comparação entre frequências genótípicas e alélicas por qui-quadrado não encontramos diferença estatística significante.

Tabela 8. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* em pessoas com anemia falciforme

	Frequências Genotípicas				P	Frequências alélicas		p
	N	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
<i>ECA1</i>		DD	ID	II		D	I	
Total	392	132 (33.7)	185 (47.2)	75 (19.1)		449 (57.3)	335 (42.7)	
Mulheres	222	70 (31.5)	107 (48.2)	45 (20.3)	0,885	247 (55.6)	197 (44.4)	0,569
Homens	170	62 (36.5)	78 (45.9)	30 (17.6)		202 (59.4)	138 (40.6)	
<i>ECA2</i>		GG	AG	AA		G	A	
Total	342							
Mulheres	192	87 (45.3)	77 (40.1)	28 (14.6)		251 (65.4)	133 (34.6)	0,246
Homens	150					90 (60.0)	60 (40.0)	
<i>PAI-1</i>		4G/4G	4G/5G	5G/5G		4G	5G	
Total	367	48 (13.0)	143 (39.0)	176 (48.0)		239 (32.6)	495 (67.4)	
Mulheres	206	28 (13.6)	89 (43.2)	89 (43.2)	0,345	145 (35.2)	267 (64.8)	0,227
Homens	161	20 (12.4)	54 (33.6)	87 (54.0)		94 (29.2)	228 (70.8)	

Na tabela 9, estão apresentadas as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos de acordo com a ocorrência das manifestações clínicas estudadas.

Tabela 9. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* em pessoas com anemia falciforme com e sem a presença de Síndrome Torácica Aguda e Acidente

Vascular Encefálico

Genótipos/Alelos	c/ STA	s/ STA	c/ AVE	s/ AVE
<i>ECA1 (rs1799752)</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>N(%)</i>	<i>N(%)</i>
<i>Genótipos</i>	n=235	n=157	n=76	n=316
II	44 (18,7)	31 (19,7)	16 (21,1)	59 (18,7)
ID	110 (46,8)	75 (47,8)	30 (39,5)	155 (49,1)
DD	81 (34,5)	51 (32,5)	30 (39,5)	102 (32,3)
<i>Alelos</i>				
I	198 (42,1)	137 (43,6)	62 (40,8)	273 (43,2)
D	272 (57,9)	177 (56,4)	90 (59,2)	359 (56,8)
<i>PAI-1(rs1799889)</i>				
<i>Genótipos</i>	n=218	n=149	n=72	n=295
4G/4G	23 (10,6)	25 (16,8)	08 (11,1)	40 (13,6)
4G/5G	86 (39,4)	57 (38,3)	30 (41,7)	113 (38,3)
5G/5G	109 (50,0)	67 (45,0)	34 (47,2)	142 (48,1)
<i>Alelos</i>				
4G	132 (30,3)	107 (35,9)	46 (31,9)	193 (32,7)
5G	304 (69,7)	191 (64,1)	98 (68,1)	397 (67,3)
<i>ECA2(rs2106809)</i>	Mulheres			
<i>Genótipos</i>	n=115	n=77	n=34	n=158
GG	53 (46,1)	34 (44,2)	15 (44,1)	72 (45,6)
AG	46 (40,0)	31 (40,2)	14 (41,2)	63 (39,9)
AA	16 (13,9)	12 (15,6)	05 (14,7)	23 (14,5)
<i>Alelos</i>				
G	152 (57,9)	99 (56,4)	44 (64,7)	207 (65,5)
A	78 (42,1)	55 (43,6)	24 (35,3)	109 (34,5)
<i>ECA2(rs2106809)</i>	Homens			
<i>Alelos</i>	n=88	n=62	n=35	n=115
G	52 (59,1)	38 (61,3)	21 (60,0)	69 (60,0)
A	36 (40,9)	24 (38,7)	14 (40,0)	46 (40,0)

O genótipo mais frequente entre as pessoas que apresentaram STA foram o I/D (46,8%), o 5G/5G (50%) e G/G (46,1%) para as mulheres e o alelo G (59,1%) para os homens. Entre as pessoas que apresentaram AVE os genótipos mais frequentes foram o I/D e D/D apresentando a mesma frequência (39,5%), o 5G/5G (47,1%) e G/G (44,1%) e do alelo G (60%) para mulheres e homens, respectivamente.

Afim de verificar se a presença destes polimorfismos estaria associada à ocorrência das manifestações clínicas estudadas, foi realizada a análise de regressão logística múltipla para obtenção dos valores de *Odds Ratio* (OR), por modelo de herança recessivo ou dominante e foi verificado se há influência do gênero ou idade. Utilizamos amostras com todos os três polimorfismos genotipados, compreendendo 338 amostras, 189 do sexo feminino e 149 do sexo masculino, destas 199 apresentaram STA e 69 apresentaram AVE. Os genótipos encontrados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Número de pessoas com anemia falciforme encontradas com os polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* com e sem a presença de STA e AVE

Genótipos/Alelos	c/ STA	c/ AVE
<i>ECA1 (rs1799752)</i>	n= 199	n= 69
<i>Genótipos</i>	N (%)	N (%)
II	43	15
ID	90	28
DD	66	26
<i>PAI-1(rs1799889)</i>		
<i>Genótipos</i>		
4G/4G	22	8
4G/5G	75	27
5G/5G	102	34
<i>ECA2(rs2106809)</i>		
<i>Genótipos</i>		
GG	103	36
AG	46	14
AA	50	19

Os resultados encontrados na análise de associação entre os modelos de herança recessivo e dominante dos polimorfismos e a presença de STA estão exibidos na tabela 11. Não encontramos diferença significativa para influência do gênero ou idade nesta análise nem para a

associação entre os polimorfismos e a ocorrência de STA, os valores de *OR* encontrados foram próximos de um, sem apresentar diferença.

Tabela 11: Valores de *Odds Ratio* encontrados para os modelos de herança recessivo e dominante para os polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAII* em pessoas que apresentaram STA

Gene	Modelos de herança	OR (IC 95%)	P
	Idade	0.99 (0.97 - 1.01)	0.306
	Gênero	1.08 (0.64 - 1.83)	0.761
<i>ECA1</i>	Recessivo (DD vs. ID + II)	1.02 (0.62 - 1.68)	0.929
	Dominante (DD + ID vs. II)	0.92 (0.52 - 1.65)	0.788
<i>ECA2</i>	Recessivo (GG vs. AG + AA)	0.98 (0.54 - 1.83)	0.972
	Dominante (GG + AG vs. AA)	1.05 (0.51 - 2.17)	0.894
<i>PAII</i>	Recessivo (4G/4G vs. 4G/5G + 5G/5G)	0.64 (0.32 - 1.28)	0.206
	Dominante (4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	0.98 (0.61 - 1.59)	0.949

OR: *Odds Ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança a 95%.

Na tabela 12 a seguir estão apresentados os valores de *OR* encontrados entre os modelos de herança dos polimorfismos e a presença de AVE. Não foi encontrada influência do gênero ou idade nesta análise. O valor de *OR* foi 1.36 para o modelo recessivo do polimorfismo I/D no gene *ECA1*, porém sem apresentar diferença estatística, os demais valores encontrados foram próximos a um, sem apresentar diferença.

Tabela 12: Valores de *Odds Ratio* encontrados para os modelos de herança recessivo e dominante para os polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAII* em pessoas que apresentaram AVE

Gene	Modelo de Herança	OR (95% CI)	p
	Idade	0.98 (0.96 - 1.00)	0.084
	Gênero	0.79 (0.42 - 1.51)	0.480
<i>ECA1</i>	Recessivo (DD vs. ID + II)	1.36 (0.74 - 2.51)	0.313
	Dominante (DD + ID vs. II)	0.84 (0.41 - 1.72)	0.641
<i>ECA2</i>	Recessivo (GG vs. AG + AA)	0.96 (0.44 - 2.12)	0.937
	Dominante (GG + AG vs. AA)	0.98 (0.40 - 2.45)	0.976
<i>PAII</i>	Recessivo (4G/4G vs. 4G/5G + 5G/5G)	0.79 (0.33 - 1.93)	0.614
	Dominante 4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	1.18 (0.66 - 2.13)	0.562

OR: *Odds Ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança a 95%.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é importante na manutenção da homeostase vascular. Suas ações incluem a regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo por meio do equilíbrio hídrico e eletrolítico, vasodilatação e vasoconstrição (HERICHOVA; SZANTOOVA, 2013). Os polimorfismos I/D no gene *ECA1* e A/G no gene *ECA2*, estudados nesse trabalho, tem ação regulatória sobre as enzimas conversoras de angiotensina 1 e 2 (*ECA1* e *ECA2*) que fazem parte do SRA. A *ECA1* é a principal enzima do SRAA e sua função principal é clivar o decapeptídeo inativo angiotensina I, retirando dois aminoácidos C-terminais, formando a angiotensina II (Ang II), o principal componente ativo do SRA.

Juntas, a *ECA1* e a Ang II têm ação vasoconstritora direta ou indireta, por meio da liberação de endotelina, aumentando o tônus simpático ou causando a redução da liberação de óxido nítrico pela inativação da bradicinina.

O polimorfismo de inserção ou deleção de 287 pares de bases no gene *ECA1* está relacionado com os níveis plasmáticos de *ECA1*, sendo o alelo D associado a maiores níveis da enzima, e a homozigose associada a até duas vezes mais atividade da *ECA1*, quando comparado ao homozigoto II (SAYED-TABATABAEI et al., 2006). Uma maior ação da *ECA1*, e conseqüentemente maiores níveis de Ang II, são descritos como fatores agravantes de doenças como hipertensão, doença coronariana e aborto espontâneo (PEREZA et al., 2016; SAKHTEH et al., 2015).

Nos nossos resultados encontramos uma frequência alélica de 57,3% do alelo D, entre as pessoas com anemia falciforme que compõem o grupo de estudo. Embora com uma frequência alélica maior em relação ao alelo I, estatisticamente não há associação na ocorrência de STA e AVE. Mahjoub e colaboradores em estudo realizado com um grupo de pessoas com AF no Sudão encontrou a frequência do genótipo DD de 42% e uma maior frequência do genótipo ID (50%), além disso também não encontrou associação entre este genótipo e a ocorrência de STA no grupo estudado (MAHJOUB et al., 2016). A presença do alelo D, considerada deletéria em algumas condições clínicas, não se mostrou deletéria neste grupo e não se relacionou a um maior risco de ocorrência das manifestações clínicas estudadas.

Uma enzima homóloga a ECA1, a ECA2, está envolvida em um mecanismo compensatório, regulando a ação vasoconstritora do eixo central do SRA que envolve ECA1-Ang-II. A ECA2 é capaz de clivar apenas um aminoácido da Ang I, gerando a Ang 1-9, ou da Ang II gerando a Ang 1-7, que têm ação vasodilatadora. Além disso, a ação da ECA1 de clivar dois aminoácidos a partir da Ang 1-9 também gera a Ang 1-7. Dessa forma o eixo ECA2-Ang 1-7 tem ação vasodilatadora para contrabalancear os efeitos vasoconstritores, podendo ter um efeito protetor para doenças relacionadas à pressão sanguínea. Alguns estudos tentaram relacionar a presença de polimorfismos no gene *ECA2* com hipertensão arterial, porém não foi confirmada essa associação (BENJAFIELD; WANG; MORRIS, 2004).

Neste trabalho estudamos o polimorfismo A/G no gene *ECA2*, que consiste em uma troca de base, uma adenina por uma guanina (A→G), na posição 1075 do íntron I do gene. Como o gene se localiza no cromossomo X, as análises foram realizadas separadamente para homens e mulheres e ambos apresentaram uma maior frequência do alelo G. No entanto, na análise de regressão não foi encontrada relação de proteção ou risco para a ocorrência de STA ou AVE nesse grupo.

O polimorfismo 4G/5G no gene *PAI-1*, associado à fibrinólise, também não apresentou influência na ocorrência das manifestações clínicas avaliadas. O alelo 4G está relacionado a maiores níveis de PAI-1 e uma menor produção de plasmina, sendo considerado deletério e relacionado ao agravamento de doenças cardiovasculares e a ocorrência de complicações gestacionais (KOHLENER; GRANT, 2000; MORGAN; BOMBELL; MCGUIRE, 2013). Em pessoas com AF, é descrito que os níveis plasmáticos de PAI-1 são elevados durante o estado estacionário e mais ainda durante as crises vaso-oclusivas devido à expressão de PAI-1, que pode ser induzida por fatores promotores de hipóxia, uma condição comum nas pessoas com AF (LIAO et al., 2007; PATEL et al., 2010). Neste estudo encontramos uma frequência baixa do genótipo 4G/4G (13%) em relação aos outros genótipos, um resultado também encontrado em outros estudos. Não encontramos relação entre a presença deste genótipo e a ocorrência das manifestações clínicas.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusões

1. Para o polimorfismo I/D no gene *ECA1* encontramos maior frequência do genótipo I/D e do alelo D no grupo estudado, para o polimorfismo A/G no gene *ECA2* encontramos maior frequência do genótipo GG entre as mulheres e maior frequência do alelo G. Encontramos maior frequência do genótipo 5G/5G para o polimorfismo no gene *PAII*, e do alelo 5G. Não encontramos diferença significativa nas frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos.
2. Na análise de regressão logística múltipla para verificar a associação entre os polimorfismos e STA e AVE, não encontramos valores significativos de *Odds Ratio*, indicando que no grupo estudado não há associação entre os polimorfismos e a ocorrência das manifestações clínicas.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências

- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 6, p. 615–621, 2008.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. September 2009, p. 6–13, 2010.
- BARBER, R. C. et al. Epistatic interactions are critical to gene-association studies: PAI-1 and risk for mortality after burn injury. **Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association**, v. 29, n. 1, p. 168–175, 2008.
- BENJAFIELD, A. V.; WANG, W. Y. S.; MORRIS, B. J. No association of angiotensin-converting enzyme 2 gene (ACE2) polymorphisms with essential hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 7, p. 624–628, 2004.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o Diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. São José do Rio Preto: Editora HN, 2006.
- CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 771–784, 2005.
- EVANGELISTA, F. C. G. et al. Lack of association between potential prothrombotic genetic risk factors and arterial and venous thrombosis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9585–9594, 2015.
- GLADWIN, M. T.; VICHINSKY, E. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, p. 2254–2265, 2008.
- HEBBEL, R. P. Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: Relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 181–198, 2014.
- HERICHOVA, I.; SZANTOOVA, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. **Endocrine regulations**, v. 47, p. 39–52, 2013.
- KOHLER, H. P.; GRANT, P. J. Plasminogen-Activator Inhibitor Type 1 and Coronary Artery Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 24, p. 1792–1801, 2000.
- LIAO, H. et al. Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1alpha, and C/EBPalpha. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, p. 935–949, 2007.
- LIMA, L. M. et al. Associação dos Níveis Plasmáticos de PAI-1 e Polimorfismo 4G/5G em Pacientes com Doença Arterial Coronariana. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 97, n. 6, p. 462–467, 2011.
- LIU, D. et al. Association between circulating levels of ACE2-Ang-(1-7)-MAS axis and ACE2 gene polymorphisms in hypertensive patients. **Medicine**, v. 95, n. 24, p. e3876, 2016.
- MAGDOUD, K. et al. Plasminogen Activator Inhibitor 1 4G/5G and -844G/A Variants in

- Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 70, n. 3, p. 246–252, 2013.
- MAHJOUB, S. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with vasoocclusive complications of sickle cell anemia. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 4, p. 267, 2016.
- MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v. 19, n. 6, p. 790–792, 1965.
- MENDOZA, A.; LAZARTIGUES, E. The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, p. 1–8, 2015.
- MORGAN, J. A.; BOMBELL, S.; MCGUIRE, W. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 (-675 4G/5G) Polymorphism with Pre-Eclampsia: Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Santos: [s.n.].
- PALMER, B. R. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort. **American Heart Journal**, v. 156, n. 4, p. 752–758, 2008.
- PATEL, N. et al. Placenta Growth Factor (PlGF), a novel inducer of Plasminogen Activator Inhibitor -1 (PAI-1) in Sickle Cell Disease (SCD). **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16713–16722, 2010.
- PEREZA, N. et al. Insertion/deletion polymorphism in intron 16 of ACE gene in idiopathic recurrent spontaneous abortion: case-control study, systematic review and meta-analysis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 2, p. 237–246, fev. 2016.
- PRASAD, A et al. The insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene determines coronary vascular tone and nitric oxide activity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 5, p. 1579–1586, 2000.
- RAHIMI, Z.; MORADI, M.; NASRI, H. A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus , diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. **Journal of Research in Medical Sciences**, n. November, 2014.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.
- RIGAT, B. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **The Journal of clinical investigation**, v. 86, n. 4, p. 1343–6, 1990.
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 1985.
- SAKHTEH, M. et al. Polymorphism and synergism of angiotensin-converting enzyme (ACE) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genes in coronary artery disease. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 4, p. 1168–1174, 1 dez. 2015.
- SANTOS, R. A S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: New players of the renin-angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, 2013.

- SAYED-TABATABAEI, F. A. et al. ACE polymorphisms. **Circulation Research**, v. 98, p. 1123–1133, 2006.
- SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **American Journal of Clinical Pathology**, 1975.
- SIMSEK, S. et al. The insertion/deletion polymorphism in the ACE gene and chronic obstructive pulmonary disease. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 2, p. 1392–1398, 2013.
- 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.
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 440–442, 1968.
- VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 2002.
- WAJCMAN, H.; MORADKHANI, K. Abnormal haemoglobins: detection & characterization. **Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. October, p. 538–546, 2011.
- WEBB, J.; KWIATKOWSKI, J. L. Stroke in patients with sickle cell disease. **Expert Reviews Hematology**, v. 6, n. 3, p. 301–316, 2013.
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.
- ZORIO, E. et al. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 9, p. 923–929, 2008.

8. Apêndices

8.1 Apêndice 1 – Artigo Científico

Polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* e sua relação com a ocorrência de Síndrome Torácica Aguda e Acidente Vascular Encefálico em pessoas com Anemia Falciforme

Mariana Salvarani¹, Jéssika Viviani Okumura¹, Edis Belini-Junior¹, Vanessa Urbinatti Teixeira¹, Clarisse Lopes de Castro Lobo², Claudia Regina Bonini-Domingos¹

¹Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, Brasil

²Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth CEP 15054-000 - São José do Rio Preto, SP.

e-mail: marianasalvarani@gmail.com

Resumo

A Anemia falciforme (AF) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela presença da hemoglobina S (Hb S) em homozigose (*HBB*^{Glu6Val}). Em condições de baixa tensão de oxigênio e acidose a Hb S tende a formar polímeros, deformando os eritrócitos e acarretando vaso-oclusão e hemólise, com diversas manifestações clínicas. A regulação da vasoconstrição e vasodilatação e dos processos de fibrinólise são fatores que podem influenciar na ocorrência de síndrome torácica aguda (STA) e acidente vascular encefálico (AVE), duas das mais importantes manifestações clínicas da anemia falciforme. Neste trabalho avaliamos a frequência dos polimorfismos nos genes *ECA1* e *ECA2*, que estão relacionados com a regulação da pressão sanguínea e calibre venoso, e no gene *PAI1* que está relacionado com a degradação de coágulos de fibrina, em um grupo de pessoas com anemia falciforme a fim de verificar se a presença destes polimorfismos estaria relacionada com a ocorrência de STA e AVE. Foram genotipadas 392 pessoas com anemia falciforme para os polimorfismos I/D no gene *ECA1* (17q23), A1075G no gene *ECA2* (Xp22) e 4G/5G no gene *PAI1* (7q22.1) e obtidas as informações das manifestações clínicas a partir dos prontuários médicos. Foi realizada análise de regressão logística múltipla para os diferentes modelos de herança e presença de STA e AVE. Não encontramos diferença significativa entre as frequências dos polimorfismos estudados ou na associação com a presença das manifestações clínicas, indicando que os polimorfismos estudados não estão associados à ocorrência destas manifestações clínicas, em anemia falciforme.

Palavras-chave: anemia falciforme, enzima conversora de angiotensina, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, polimorfismos.

Introdução

A doença falciforme (DF) é uma doença de abrangência mundial, classificada pela presença predominante da hemoglobina S (Hb S). É causada por uma mutação pontual no gene da beta globina (*HBB*) que leva a troca de um nucleotídeo, uma timina por uma adenina ($G\underline{T}G \rightarrow G\underline{A}G$), resultando na substituição do sexto aminoácido da cadeia globínica, um ácido glutâmico por uma valina (*HBB*^{Glu6Val}). A presença da mutação em homozigose caracteriza a anemia falciforme, de origem autossômica recessiva. Em condições de desoxigenação e acidose, a Hb S tende a formar polímeros no interior dos eritrócitos, o que proporciona à célula o formato de foice, característico da doença, e causa a perda da flexibilidade e danos na membrana da célula levando a processos de vaso-oclusão e hemólise^{1,2}.

Síndrome torácica aguda (STA) e acidente vascular encefálico (AVE) são as manifestações clínicas mais frequentes em pessoas com AF. A STA é uma complicação pulmonar que inclui sintomas respiratórios e febre, e pode progredir para falência respiratória aguda causando morbidade e morte. As causas da STA incluem infecções pulmonares (virais ou bacterianas), embolia gordurosa, tromboembolismo e oclusão microvascular³. O AVE é uma síndrome neurológica que ocorre em função da obstrução de vasos ou hemorragia, acomete principalmente adultos a partir dos vinte anos e pode ocorrer em crianças causando morbidade ou morte^{4,5}.

Essas manifestações clínicas podem estar relacionadas com processos vaso-oclusivos e eventos trombóticos. Assim, a regulação da vasoconstrição e vasodilatação é um fator importante na modulação das manifestações clínicas na AF. Os polimorfismos nos genes que produzem duas enzimas que atuam nessa regulação – enzima conversora de angiotensina 1 e 2 (ECA1 e ECA2) – e o polimorfismo no gene do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), envolvido na fibrinólise, são estudados no presente trabalho.

Os polimorfismos encontrados nos genes *ECA1* e *ECA2* são amplamente estudados como moduladores da pressão sanguínea e vasoconstrição. O polimorfismo I/D do gene *ECA1* (rs1799752) localizado no cromossomo 17 (17q23) é um dos mais estudados devido à sua importância clínica. A presença do alelo D está associada ao aumento da transcrição do RNA mensageiro aumentando os níveis plasmáticos da ECA, com conseqüente aumento nos níveis de angiotensina II,

elevando a ação vasoconstritora ⁶⁻⁹. No gene *ECA2*, localizado no cromossomo X (Xp22), o polimorfismo estudado é o de troca de uma adenina por uma guanina na posição 1075 no íntron I do gene. A herança do polimorfismo estaria relacionada à efeito protetor em doenças como a hipertensão ^{7,10}.

A coagulação sanguínea também está associada às manifestações clínicas da DF com eventos trombóticos. O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) atua na fibrinólise inibindo os ativadores do plasminogênio (tPA e uPA) e consequentemente a formação da plasmina, responsável pela degradação dos coágulos de fibrina ¹¹. O polimorfismo 4G/5G na região promotora do gene *PAI1* (rs1799889), localizado no cromossomo 7 (7q22.1) é bastante estudado. A presença do alelo 4G em homozigose é conhecida por causar elevação nos níveis plasmáticos de PAI-1. As consequências da elevação de PAI-1 estão relacionadas com a diminuição da fibrinólise, criando um estado pró-trombótico que pode predispor às manifestações clínicas características da AF ¹¹⁻¹³.

Os polimorfismos genéticos que regulam os níveis destas proteínas podem estar associados com a gravidade da DF, uma vez que alteram a resposta individual à doença e o tratamento. O entendimento de como fatores genéticos podem influenciar a fisiopatologia da doença, pode prover um tratamento individualizado e mais eficiente. Com isso pretendemos verificar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* e correlacionar com a presença de AVE e STA em pessoas com Anemia Falciforme.

Casuística

O grupo de estudo foi composto por 392 pessoas com anemia falciforme, com idades entre 10 e 65 anos (mediana de 23, DP: 13), sendo 223 do sexo feminino e 170 do sexo masculino, provenientes do Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” – RJ. As amostras foram previamente genotipadas para confirmação do perfil homozigoto para Hb S. O Termo de Consentimento foi obtido de todas as pessoas que participaram do estudo e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEMORIO.

Métodos

Caracterização fenotípica e genotípica

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 4 mL contendo EDTA 5% e enviadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas onde foram realizados os testes de triagem de hemoglobinopatias - eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino (pH 8,6) ¹⁴ e ácido (pH 6,2) ¹⁵, resistência globular osmótica ¹⁶, análise da morfologia eritrocitária ¹⁷ - e análise cromatográfica para caracterização do perfil de hemoglobinas (Ultra²- Trinity Biotech®). Posteriormente foi realizada a extração de DNA genômico, a partir de leucócitos, pelo método de fenol-clorofórmio ^{18,19} para as análises moleculares por PCR. As informações das manifestações clínicas foram obtidas por meio de avaliação dos prontuários.

Caracterização genotípica da Doença Falciforme

A detecção da mutação para a Hb S no gene da beta globina (*HBB*:c.20A>T - rs334) foi realizada por PCR-RFLP, utilizando os *primers* sense 5'-GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA-3' e *antisense* 5'-ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC-3', e a enzima de restrição Ddel (C↓TNAG) ²⁰.

Genotipagem dos polimorfismos dos genes ECA1, ECA2 e PAI-1

A genotipagem do polimorfismo de inserção/deleção de 287 pb (rs1799752) no gene *ECA1* (17q23.3) foi realizada por meio de duas amplificações, a primeira utilizando os *primers* ECA 1 (sense) 5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3' e ECA 2 (antisense) 5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3' e a segunda, para a confirmação dos homozigotos para o alelo I, utilizando os *primers* ECA 3 (sense) 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3' e ECA 4 (antisense) 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA T 3'²¹. Para a genotipagem do polimorfismo no intron I (1075A>G) do gene da *ECA2* (Xp22) foi utilizado PCR-RFLP com os *primers* P1 5' TAA CAA GTG CAA GGA TTT AGG 3' e P2 5' AAG CTG CAA TGA ATC ATG AT 3', após a amplificação, o fragmento de 471 pb foi digerido pela enzima *AvaII* ¹⁰. O polimorfismo de inserção/deleção de 4G/5G (rs1799889) na região promotora (-675 pb) do gene *PAI1* (7q22.1) também foi avaliado por PCR-RFLP, utilizando os *primers* PAI 1 (sense) 5' CAC AGA GAG AGT CTG GCC ACG T 3', PAI 2 (antisense) 5'CCT AGA CAA TCA CGT GGC TG 3', e a enzima *Bsella* ²².

Análise Estatística

Realizamos a análise de regressão logística múltipla utilizando o software BioEstat 5.0, para a obtenção dos valores de *Odds Ratio* nos modelos de herança recessivo e dominante e qui-quadrado para a comparação das frequências. Foram considerados significantes os valores de $p < 0.05$.

Resultados

As frequências genótípicas e alélicas encontradas para os polimorfismos nos genes estudados estão representadas na tabela 1 a seguir. Como o gene *ECA2* está localizado no cromossomo X, são apresentadas as frequências genótípicas e alélicas encontradas entre as mulheres e as frequências alélicas encontradas entre os homens, separadamente.

Foram genotipadas 392 amostras para o polimorfismo I/D no gene *ECA1*, 367 amostras para o polimorfismo no gene *PAI1* e 342 amostras para o polimorfismo A/G no gene *ECA2*, sendo 192 mulheres e 150 homens.

Para todos os polimorfismos avaliados, com exceção do polimorfismo da *ECA2*, foi verificada uma frequência genotípica e alélica semelhante entre homens e mulheres. O genótipo mais frequente para o polimorfismo no gene *ECA1* foi o heterozigoto I/D (47,2%) e o alelo mais frequente foi o D (57,3%). Para o *ECA2*, o genótipo mais frequente foi o G/G (45,3%) entre as mulheres e o alelo G para homens e mulheres (60% e 65,4%, respectivamente) e para o *PAI1*, o genótipo mais frequente foi o 5G/5G (48%) e o alelo 5G (67,4%), apresentando frequência baixa do genótipo 4G/4G (13%). Na comparação entre frequências genótípicas e alélicas não encontramos diferença estatística significativa.

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* em pessoas com anemia falciforme.

	Frequências Genotípicas				p	Frequências alélicas		
	n	n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	p
<i>ECA1</i>		DD	ID	II		D	I	
Total	392	132 (33.7)	185 (47.2)	75 (19.1)		449 (57.3)	335 (42.7)	
Mulheres	222	70 (31.5)	107 (48.2)	45 (20.3)	0,885	247 (55.6)	197 (44.4)	0,569
Homens	170	62 (36.5)	78 (45.9)	30 (17.6)		202 (59.4)	138 (40.6)	
<i>ECA2</i>		GG	AG	AA		G	A	
Total	342							
Mulheres	192	87 (45.3)	77 (40.1)	28 (14.6)		251 (65.4)	133 (34.6)	0,246
Homens	150					90 (60.0)	60 (40.0)	
<i>PAI1</i>		4G/4G	4G/5G	5G/5G		4G	5G	
Total	367	48 (13.0)	143 (39.0)	176 (48.0)		239 (32.6)	495 (67.4)	
Mulheres	206	28 (13.6)	89 (43.2)	89 (43.2)	0,345	145 (35.2)	267 (64.8)	0,227
Homens	161	20 (12.4)	54 (33.6)	87 (54.0)		94 (29.2)	228 (70.8)	

Afim de verificar se a presença destes polimorfismos influenciaria na ocorrência das manifestações clínicas estudadas, foi realizada a análise de regressão logística múltipla para obtenção dos valores de *Odds Ratio*, e também verificamos se há influência do gênero ou idade. Para esta análise utilizamos amostras com todos os três polimorfismos genotipados, compreendendo 338 amostras, 189 do sexo feminino e 149 do sexo masculino, realizando a análise por modelos de herança recessivo ou dominante. Das amostras utilizadas para esta análise 199 apresentaram STA e 69 apresentaram AVE, os genótipos encontrados estão representados na tabela 2.

Tabela 2.. Número de pessoas com anemia falciforme encontradas com os polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI-1* com e sem a presença de STA e AVE

Genótipos/Alelos	c/ STA	c/ AVE
<i>ECA1 (rs1799752)</i>	n= 199	n= 69
<i>Genótipos</i>	n	n
II	43	15
ID	90	28
DD	66	26
<i>PAI1(rs1799889)</i>		
<i>Genótipos</i>		
4G/4G	22	8
4G/5G	75	27
5G/5G	102	34
<i>ECA2(rs2106809)</i>		
<i>Genótipos</i>		
GG	103	36
AG	46	14
AA	50	19

Os resultados encontrados da análise de associação entre os modelos de herança recessivo e dominante dos polimorfismos e a presença de STA estão apresentados na tabela 3. Não encontramos diferença significativa para influência do gênero ou idade nesta análise nem para a associação entre os polimorfismos e a ocorrência de STA. Os valores de *Odds Ratio* encontrados foram próximos de um, sem apresentar diferença.

Tabela 3: Valores de *Odds Ratio* encontrados para os modelos de herança recessivo e dominante para os polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI1* em pessoas que apresentaram STA.

Gene	Modelos de herança	OR (IC 95%)	p
	Idade	0.99 (0.97 - 1.01)	0.306
	Gênero	1.08 (0.64 - 1.83)	0.761
ECA1	Recessivo (DD vs. ID + II)	1.02 (0.62 - 1.68)	0.929
	Dominante (DD + ID vs. II)	0.92 (0.52 - 1.65)	0.788
ECA2	Recessivo (GG vs. AG + AA)	0.98 (0.54 - 1.83)	0.972
	Dominante (GG + AG vs. AA)	1.05 (0.51 - 2.17)	0.894
PAI1	Recessivo (4G/4G vs. 4G/5G + 5G/5G)	0.64 (0.32 - 1.28)	0.206
	Dominante (4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	0.98 (0.61 - 1.59)	0.949

OR: *Odds Ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança a 95%.

Na tabela 4 a seguir estão apresentados os valores de Odds Ratio encontrados entre os modelos de herança dos polimorfismos e a presença de AVE. Não foi encontrada influência do gênero ou idade nesta análise. Foi encontrado o valor de OR 1.36 para o modelo recessivo do polimorfismo I/D no gene *ECA1*, porém sem apresentar diferença estatística, os demais valores encontrados foram próximos a um, sem apresentar diferença.

Tabela 4: Valores de *Odds Ratio* encontrados para os modelos de herança recessivo e dominante para os polimorfismos nos genes *ECA1*, *ECA2* e *PAI1* em pessoas que apresentaram AVE.

		OR (95% CI)	p
	Idade	0.98 (0.96 - 1.00)	0.084
	Gênero	0.79 (0.42 - 1.51)	0.480
ECA1	Recessivo (DD vs. ID + II)	1.36 (0.74 - 2.51)	0.313
	Dominante (DD + ID vs. II)	0.84 (0.41 - 1.72)	0.641
ECA2	Recessivo (GG vs. AG + AA)	0.96 (0.44 - 2.12)	0.937
	Dominante (GG + AG vs. AA)	0.98 (0.40 - 2.45)	0.976
PAI1	Recessivo (4G/4G vs. 4G/5G + 5G/5G)	0.79 (0.33 - 1.93)	0.614
	Dominante 4G/4G + 4G/5G vs. 5G/5G)	1.18 (0.66 - 2.13)	0.562

OR: *Odds Ratio*; IC 95%: Intervalo de confiança a 95%.

Discussão

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é importante na manutenção da homeostase da pressão sanguínea. Suas ações incluem a regulação da pressão arterial e do volume sanguíneo por meio do equilíbrio hídrico e eletrolítico, vasodilatação e vasoconstrição⁶. Os polimorfismos I/D no gene *ECA1* e A1075G no gene *ECA2*, estudados nesse trabalho, tem ação regulatória sobre as enzimas conversoras de angiotensina 1 e 2 (*ECA1* e *ECA2*) que fazem parte do SRA. A *ECA1* é a principal enzima do SRA e sua função principal é clivar o decapeptídeo inativo angiotensina I, retirando dois aminoácidos C-terminais, formando a angiotensina II (Ang II), o principal componente ativo do SRA. Juntas, a *ECA* e a Ang II têm ação vasoconstritora direta ou indireta, por meio da liberação de endotelina, aumentando o tônus simpático ou causando a redução da liberação de óxido nítrico pela inativação da bradicinina^{8,23}.

O polimorfismo de inserção ou deleção de 287 pares de bases no gene *ECA1* está relacionado com os níveis plasmáticos de *ECA*, sendo o alelo D associado a maiores níveis da enzima, e a homozigose associada a até duas vezes mais atividade da *ECA*, quando comparado ao homozigoto II⁷. Uma maior ação da *ECA*, e conseqüentemente maiores níveis de Ang II, são descritos como fatores agravantes de doenças como hipertensão, doença coronariana e aborto espontâneo^{24,25}.

Nos nossos resultados encontramos uma frequência alélica de 57,3% do alelo D, entre as pessoas com anemia falciforme que compõem o grupo de estudo. Embora com uma frequência alélica maior em relação ao alelo I, estatisticamente não influenciou na ocorrência de STA e AVE. Mahjoub e colaboradores em estudo realizado com um grupo de pessoas com AF no Sudão encontrou a frequência do genótipo DD de 42% e uma maior frequência do genótipo ID (50%), além disso também não encontrou associação entre este genótipo e a ocorrência de STA no grupo estudado²⁶. A presença do alelo D, considerada deletéria em algumas condições clínicas, não se mostrou deletéria neste grupo e não se relacionou a um maior risco de ocorrência das manifestações clínicas estudadas.

Uma enzima homóloga a *ECA*, a *ECA2*, está envolvida em um mecanismo compensatório, regulando a ação vasoconstritora do eixo central do SRA que envolve *ECA1*-Ang-II. A *ECA2* é capaz de clivar apenas um aminoácido da Ang I,

gerando a Ang 1-9, ou da Ang II gerando a Ang 1-7, que têm ação vasodilatadora. Além disso, a ação da ECA1 de clivar dois aminoácidos a partir da Ang 1-9 também gera a Ang 1-7. Dessa forma o eixo ECA2-Ang 1-7 tem ação vasodilatadora para contrabalancear os efeitos vasoconstritores, podendo ter um efeito protetor para doenças relacionadas à pressão sanguínea. Alguns estudos tentaram relacionar a presença de polimorfismos no gene *ECA2* com hipertensão arterial, porém não foi confirmada essa associação ^{10,27}.

Neste trabalho estudamos o polimorfismo A1075G no gene *ECA2*, que consiste em uma troca de base, uma adenina por uma guanina (A→G), na posição 1075 do íntron I do gene. Como o gene se localiza no cromossomo X, as análises foram realizadas separadamente para homens e mulheres e ambos apresentaram uma maior frequência do alelo G. No entanto, na análise de regressão não foi encontrada relação de proteção ou risco para a ocorrência de STA ou AVE nesse grupo.

O polimorfismo 4G/5G no gene *PAI1*, associado à fibrinólise, também não apresentou influência na ocorrência das manifestações clínicas avaliadas. O alelo 4G está relacionado a maiores níveis de PAI-1 e uma menor produção de plasmina, sendo considerado deletério e relacionado ao agravamento de doenças cardiovasculares e a ocorrência de abortos espontâneos ²⁸. Em pessoas com AF, é descrito que os níveis plasmáticos de PAI-1 são elevados durante o estado estacionário e mais ainda durante as crises vaso-oclusivas devido à expressão de PAI-1, que pode ser induzida por fatores promotores de hipóxia, uma condição comum nas pessoas com AF ²⁹. Neste estudo encontramos uma frequência baixa do genótipo 4G/4G (13%) em relação aos outros genótipos, um resultado também encontrado em outros estudos ^{12,13}. Não encontramos relação entre a presença do alelo 4G e a ocorrência das manifestações clínicas.

Conclusão

As vias de regulação da vasoconstrição e fibrinólise, e os polimorfismos genéticos que regulam as proteínas envolvidas nestas vias, podem exercer influência no fenótipo da anemia falciforme. Entretanto, neste trabalho mostramos que a presença dos polimorfismos nos genes que modificam as proteínas ECA1, ECA2 e PAI-1 não estão associadas a ocorrência de STA e AVE nas pessoas com anemia falciforme.

Referências

1. Rees, D. C., Williams, T. N. & Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet* **376**, 2018–2031 (2010).
2. Zago, M. A. & Pinto, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **29**, 207–214 (2007).
3. Miller, A. C. & Gladwin, M. T. Pulmonary complications of sickle cell disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 1154–1165 (2012).
4. Ballas, S. K. *et al.* Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* **85**, 6–13 (2010).
5. Lawrence, C. & Webb, J. Sickle Cell Disease and Stroke: Diagnosis and Management. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **16**, 27 (2016).
6. Herichova, I. & Szantoova, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr. Regul.* **47**, 39–52 (2013).
7. Sayed-Tabatabaei, F. a., Oostra, B. a., Isaacs, a., Van Duijn, C. M. & Witteman, J. C. M. ACE polymorphisms. *Circ. Res.* **98**, 1123–1133 (2006).
8. Prasad, a, Narayanan, S., Waclawiw, M. a, Epstein, N. & Quyyumi, a a. The insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene determines coronary vascular tone and nitric oxide activity. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 1579–1586 (2000).
9. Palmer, B. R. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 A1075G polymorphism is associated with survival in an acute coronary syndromes cohort. *Am. Heart J.* **156**, 752–758 (2008).
10. Benjafeld, A. V., Wang, W. Y. S. & Morris, B. J. No association of angiotensin-converting enzyme 2 gene (ACE2) polymorphisms with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* **17**, 624–628 (2004).
11. Zorio, E. *et al.* Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr. Med. Chem.* **15**, 923–929 (2008).
12. Lima, L. M., Carvalho, M. G., Neto, C. P., Garcia, J. C. F. & Sousa, M. O.

- Associação dos Níveis Plasmáticos de PAI-1 e Polimorfismo 4G/5G em Pacientes com Doença Arterial Coronariana. *Arq. Bras. Cardiol.* **97**, 462–467 (2011).
13. Magdoud, K., Herbepin, V. G., Touraine, R., Almawi, W. Y. & Mahjoub, T. Plasminogen Activator Inhibitor 1 4G/5G and -844G/A Variants in Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. *Am. J. Reprod. Immunol.* **70**, 246–252 (2013).
 14. MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. *J. Clin. Pathol.* **19**, 790–792 (1965).
 15. VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. *Am. J. Clin. Pathol.* **49**, 440–442 (1968).
 16. SILVESTRONI, E. & BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am. J. Clin. Pathol.* (1975).
 17. BONINI-DOMINGOS, C. R. *Metodologias Laboratoriais para o Diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias*. (Editora HN, 2006).
 18. PENA, S. D. J. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis* **12**, 146–152 (1991).
 19. SAMBROOK, J., FRITCSH, E. . & MANATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
 20. Saiki, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354 (1985).
 21. Rigat, B. *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* **86**, 1343–6 (1990).
 22. Barber, R. C. *et al.* Epistatic interactions are critical to gene-association studies: PAI-1 and risk for mortality after burn injury. *J. Burn Care Res.* **29**, 168–175 (2008).
 23. Mendoza, a. & Lazartigues, E. The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges.

- Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 1–8 (2015). doi:10.1177/1753944715578056
24. Perez, N. *et al.* Insertion/deletion polymorphism in intron 16 of ACE gene in idiopathic recurrent spontaneous abortion: case-control study, systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* **32**, 237–246 (2016).
 25. Sakhteh, M. *et al.* Polymorphism and synergism of angiotensin-converting enzyme (ACE) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genes in coronary artery disease. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* **16**, 1168–1174 (2015).
 26. Mahjoub, S., Abdelrhman, E., El-Deen, M. M., Mustafa, M. E. & Ali, E. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with vasoocclusive complications of sickle cell anemia. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **6**, 267 (2016).
 27. Liu, D. *et al.* Association between circulating levels of ACE2-Ang-(1-7)-MAS axis and ACE2 gene polymorphisms in hypertensive patients. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e3876 (2016).
 28. Morgan, J. a., Bombell, S. & McGuire, W. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 (-675 4G/5G) Polymorphism with Pre-Eclampsia: Systematic Review. *PLoS One* **8**, (2013).
 29. Patel, N. *et al.* Placenta Growth Factor (PlGF), a novel inducer of Plasminogen Activator Inhibitor -1 (PAI-1) in Sickle Cell Disease (SCD). *J. Biol. Chem.* **285**, 16713–16722 (2010).