



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Patricia Pereira do Nascimento

**Influência de marcadores de hipóxia e da síntese de óxido nítrico no
processo hemolítico em anemia falciforme (Hb SS)
e malária por *Plasmodium vivax*.**

São José do Rio Preto - SP
2018

Patricia Pereira do Nascimento

**Influência de marcadores de hipóxia e da síntese de óxido nítrico no
processo hemolítico em anemia falciforme (Hb SS)
e malária por *Plasmodium vivax*.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado

Nascimento, Patrícia Pereira do.

Influência de marcadores de hipóxia e da síntese de óxido nítrico no processo hemolítico em anemia falciforme (Hb SS) e malária por *Plasmodium vivax* / Patrícia Pereira do Nascimento. -- São José do Rio Preto, 2018

134 f. : il., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Coorientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Marcadores genéticos. 3. Hipóxia. 4. Óxido nítrico sintase. 5. *Plasmodium vivax*. 6. Anemia falciforme. 7. Malária. 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

Patricia Pereira do Nascimento

**Influência de marcadores de hipóxia e da síntese de óxido nítrico no
processo hemolítico em anemia falciforme (Hb SS)
e malária por *Plasmodium vivax*.**

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

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos
UNESP-São José do Rio Preto, SP
Orientadora

Profa. Dra. Ana Paula Girol
FIPA-Catanduva, SP

Dr. Gustavo Capatti Cassiano
UNICAMP-Campinas, SP

Profa. Dra. Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP- Ilha Solteira, SP.

Profa. Dra. Isabeth da Fonseca Estevão
UFSCAR- São Carlos, SP

São José do Rio Preto
02 de março de 2018

Dedico este trabalho à minha irmã, Carolina, minha companheira e cúmplice de vida, aos meu pais, Paulo e Vera, pelo dom da vida e amor incondicional, agradeço a vocês por estarem ao meu lado sempre, agradeço por confiarem em mim, apoiarem as minhas escolhas, me ajudando, incansavelmente, na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Doutorado concedida (processo: 140533/2014-1).

*Á minha amiga e orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pela confiança, paciência e dedicação. Agradeço por todo conhecimento compartilhado, pelos momentos difíceis e de conquistas que tivemos, os quais contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal. As conversas, os cafés, o ombro amigo e até mesmo os puxões de orelha. Hoje, sem dúvidas, sou uma pesquisadora realizada por conseguir levar comigo um ‘pedacinho seu’.*

*Ao meu coorientador **Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado** por me permitir conhecer um universo científico antes nunca explorado. Agradeço por acreditar em mim e me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa. Aos esforços com a coleta das amostras e com o compartilhamento de conhecimento, tarefas por vezes despidiosas devido à distância, mas sempre realizada de modo atencioso.*

*A **Profa. Dra. Sonia Maria Oliani** por permitir a realização de algumas análises em seu laboratório, assim como a aluna de mestrado **Rafaela Molás**, por me auxiliar no estabelecimento e execução dos protocolos.*

*Ao **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida** por ceder espaço do seu laboratório para armazenamento das amostras durante a pesquisa e por sempre se fazer presente, contribuindo com a troca de conhecimento.*

*Aos profissionais da saúde que estiveram envolvidos com a coleta das amostras, em especial à **Bete, Solange e Karol**, sempre dispostas a me auxiliar. A **Clarice Lobo** e a **Thaís** por estarem sempre dispostas a nos auxiliar em nossas visitas ao HEMORIO para realização da pesquisa, assim como aos pacientes e familiares que aceitaram participar do estudo, confiando no nosso trabalho.*

À banca examinadora **Dr. Gustavo Cassiano, Dra. Ana Paula Girol, Dr. Octávio Ricci Júnior e Dra. Isabeth Estevão**, pela dedicação na avaliação desse trabalho e contribuição valiosa para a finalização dessa etapa tão importante.

Aos meus irmãos-amigos **Carolina Nascimento e Raduan Soleman** por serem meu porto seguro. Pela amizade sincera e por estarem ao meu lado sempre. Minha gratidão e amor por vocês vai além dessa vida. Obrigada por tudo. Eu amo vocês.

Aos meus amigos e exemplo de pesquisadores **Lidiane Torres**, pelo seu apoio incansável, mesmo que longe fisicamente, não me deixando desistir, por ser minha amiga e conselheira; ao **Danilo Grünig** pela dedicação nos ensinamentos e compartilhamento de conhecimento, pelo “terô” e pelas conversas. Vocês foram meu incentivo diário para realização desse trabalho.

Aos meus amigos e companheiros da biologia, **Guilherme Sabino, Marcella Tralli, Rebecca Gonçalves, Tales Augusto, Gisele Carrocini, Larissa Venancio, Renan Garcia, Jéssika Okumura, Édis Belini, Lucas Ramos, Andreia Felício e Luis Felipe Valêncio, Rodrigo Zieri**, que se fizeram presentes no meu caminho até aqui. Agradeço a amizade, os ensinamentos e o carinho de sempre.

Aos meus amigos do LHGDH que me acompanharem durante a realização desse trabalho. **Camila Zucchini, Daniel Santos, Gabriela Martins, Izabella Tambones, Letícia Sybuia, Letícia Orlandini, Mariana Ishizava, Mariana Salvarani, Mayk Santos, Nathália Rossigali, Nayara Chaves, Vanessa Urbinatti, Vanessa Cardoso, Tiago Lucena e Willian Barberino**, agradeço a presença de vocês no meu dia a dia, a amizade, companheirismo, cumplicidade, as conversas e momentos de diversão, assim como pelos “perrenges” que juntos superamos. Vocês permitiram que esses anos fossem gratificantes e leves. Meu muito obrigada a cada um de vocês!

Às minhas amigas de longa data **Claudine Marcon, Bianca Buzzi, Arícia Camargo, Victor Molina e André Gomes**, pelo companheirismo e amizade sincera. Agradeço por estarem sempre dispostos a me apoiar e na torcida pelas minhas conquistas. Obrigada por sempre estarem “aqui”!!

*Aos amigos que pude conhecer ao longo dessa jornada **Elton Boina, Natan dos Santos, Paulo Galão, Luciane Barcelos, Juliane Scheneiker, Aline Moura, Carlos Fossa, Renan Barlete, Mizael Ferreira, Melissa Soleman, Maicon Petrônio, Eliane Gonçalves, Hérika Barbosa, Tatiana Penã.** Vocês foram meu apoio quando nem mesmo imaginavam. Obrigada pelo amizade e carinho comigo durante essa jornada, pelas energias boas e por torcerem pelas minhas conquistas.*

*A minha família, meus pais **Vera Lucia Pereira e Paulo Nascimento** por serem meu alicerce, meus maiores fãs e por me permitirem sonhar. Á minha irmã **Carolina Nascimento** por ser minha melhor amiga e motivação diária. Ao meu ‘paidrasto’ **Bento Fioramonte** por estar presente me incentivando nessa jornada. As minhas avós **Alice Nascimento e Antônia Pereira**, minhas tias **Lucênia Pereira e Ana Maria Nascimento**, e aos meus primos **João Eduardo, João Victor, Renata Pereira e Ricardo Pereira**, por, mesmo sem terem total conhecimento dessa caminhada, me incentivaram incansavelmente, torcendo pela minha conquista. Eu amo vocês!*

*Aos meus alunos do curso de Ciências Biológicas, **Turma 61**, que me acolheram com tanto carinho. Por confiarem em mim, me respeitarem e me permitirem realizar o sonho de estar na sala de aula. Obrigada por tudo, vocês são especiais.*

A todos os meus professores e mestres da graduação e pós-graduação, por contribuírem grandemente com a minha formação pessoal e profissional.

*Por fim e, acima de tudo, a **Deus**, e aos meus guias espirituais, por iluminarem e guiarem meus passos.*

“ Todo mundo é um gênio. Mas, se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em uma árvore, ele vai gastar a sua vida acreditando que ele é estúpido ”

Albert Einstein

HISTÓRICO

O trabalho, aqui apresentado na forma de Tese, para obtenção do título de Doutor em Biociências, Área de Concentração em Genética e Biologia Evolutiva, é resultado da pesquisa desenvolvida no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, com coorientação do Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado. O estudo teve ainda a colaboração da Médica hematologista, Clarisse Lopes de Castro Lobo, do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti- Hemorio, e de profissionais da saúde do Instituto Evando Chagas SVS/MS.

A investigação do processo de hemólise em doenças com etiologias hemolíticas distintas, surgiu em meio a resultados observados pelo nosso grupo de pesquisa, aliado a colaboradores e dados da literatura. Ao passo que nossas pesquisas mostravam que a heterogeneidade e complexidade fenotípica entre os indivíduos com anemia falciforme (AF), estavam associadas a diferentes perfis hemolíticos, que por sua vez eram influenciados por fatores genéticos, a literatura sugeria a hemólise intravascular como importante evento no estabelecimento de condições clínicas graves, em doenças em que a hemólise estava presente.

Reunindo evidências da literatura e a troca de conhecimentos entre colegas pesquisadores, nossa hipótese de que o estabelecimento do perfil hemolítico pudesse estar diferentemente associado a fatores bioquímicos e genéticos, de acordo com as características intrínsecas das diferentes doenças, nos direcionou ao estudo aqui realizado. Nesse cenário, a malária por *Plasmodium vivax* era cada vez mais foco de estudos, não só por ser uma parasitose com alta prevalência em território brasileiro, mas especialmente por ser associada, algumas vezes, a casos graves, ainda pouco compreendidos.

Apesar de eventos fisiopatológicos semelhantes como, a hemólise, inflamação, a hipóxia e ocorrência de estresse oxidativo, a malária por *P. vivax* e a anemia falciforme diferem na etiologia e características fenotípicas dos indivíduos. Enquanto a AF é uma afecção monogênica hereditária, a malária por *P. vivax* é infecção parasitária, sendo, portanto, uma doença adquirida, na qual o homem participa de uma das fases do ciclo de vida do parasito.

Estudar doenças tão distintas trouxe, por vezes, dificuldades. Seja no delineamento do estudo e estabelecimento de protocolos, de modo que as análises fossem

semelhantes para ambos os grupos, tanto quanto na obtenção de amostras e dados clínicos necessários para a conclusão da pesquisa. Entretanto, essas dificuldades permitiram o aprendizado e desenvolvimento de habilidades como a capacidade de solução e reunião de esforços de todo grupo de pesquisa, resultando na intensa troca de conhecimento científico. Assim, as adversidades ao longo do estudo foram contornadas, os objetivos cumpridos e o projeto executado de modo satisfatório.

As conclusões alcançadas até o momento resultaram na elaboração de artigos científicos já submetidos, e outros em fase de elaboração. Entre eles, o artigo “*Intravascular hemolysis in pain crises occurrence in sickle cell anemia individuals*”, submetido à revista *International Journal of Laboratory Hematology*, e o artigo “*Tracking by phylogenetic footprinting of transcription factors involved with the SNP rs7203560 and the possible influence on the expression of the alpha globin*”, submetido à revista *Hemoglobin*. Esse último, fruto de um trabalho de conclusão de curso originado a partir dessa pesquisa.

Por fim, com a finalização das análises de dados para redação da Tese, outros trabalhos serão originados. Os resultados originais aqui obtidos, em duas doenças altamente prevalentes em território Nacional, nos fazem crer que o estudo contribuiu com o conhecimento científico da área, e principalmente, com a melhor compreensão da anemia falciforme e da malária por *P. vivax*, consideradas problemas de saúde pública para a população brasileira.

RESUMO

A hemólise, processo caracterizado pela degradação de eritrócitos senescentes ou defeituosos, pode estabelecer-se de modo fisiopatológico em diferentes doenças. A ruptura do eritrócito com consequente liberação da hemoglobina (Hb) plasmática, desencadeia eventos como hipóxia e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), os quais influenciam no estabelecimento de manifestações clínicas em doenças hemolíticas. Apesar das distintas etiologias, o processo de hemólise está presente tanto entre os eventos fisiopatológicos da anemia falciforme (AF), uma anemia hemolítica caracterizada por hemólise crônica e fenótipos heterogêneos entre os indivíduos; quanto na malária por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), uma parasitose que apresenta, durante o ciclo intra-eritrocítico da doença, episódios de hemólise aguda. Assim, nosso objetivo foi avaliar a associação de marcadores bioquímicos e genéticos, envolvidos com as vias hemolíticas e da hipóxia, com o estabelecimento de diferentes perfis etiológicos de hemólise. Para isso, o grupo de estudo foi formado por indivíduos de ambos os gêneros, sendo 300 indivíduos com AF e 119 indivíduos com malária por *P. vivax*. O perfil hemolítico nesses indivíduos foi estabelecido por meio de parâmetros hematológicos e hemolíticos, comumente utilizados na rotina laboratorial. As relações entre os marcadores de hemólise, e desses com os níveis de hemoglobina plasmática (Hb plasmática), utilizada no estudo como marcador específico de hemólise intravascular, e com a proteína HIF1A, utilizada como marcador de hipóxia, foram também estabelecidas. Os marcadores genéticos foram investigados por meio da associação entre o SNP rs7203560 do gene *NPRL3*, a VNTR rs61722009 (4a4b) e o SNP rs1799983 (894G>T) do gene *eNOS*, com o perfil hemolítico, além da associação do SNP rs11549465 (1772C<T) do gene *HIF1A*, com o perfil hipóxico. Os resultados mostraram diferentes relações entre os marcadores para cada grupo de estudo. Nos indivíduos com AF, embora os marcadores de hemólise (Ret. Rel, Ret. Abs, LDH, AST e BI) estivessem correlacionados entre si, nenhum deles esteve relacionado com os níveis de Hb plasmática. Correlações positivas foram observadas entre LDH e os outros marcadores, sendo essa, a única enzima relacionada, embora negativamente, com os valores de HIF1A. Nos indivíduos com malária, os marcadores hemolíticos (AST e BI) não estiveram correlacionados entre si, mas sim com a Hb plasmática, sugerindo maior influência da hemólise intravascular no perfil hemolítico dos indivíduos com malária do nosso grupo de estudo. Quanto as mutações investigadas como marcadores genéticos, apenas o SNP rs1799983 (894G>T) do gene

eNOS apresentou maior frequência genotípica e alélica, sendo o alelo (T) assim como o genótipo homocigoto mutante (TT), mais frequente entre os indivíduos com AF. Esse SNP também esteve relacionado com o perfil hemolítico em ambos os grupos de estudo, uma vez que os indivíduos com AF e malária, com genótipos GG e GT, apresentaram aproximadamente 1,3 vezes mais Hb plasmática. A mutação VNTR rs61722009 (4a4b), também do gene *eNOS*, esteve relacionada com o perfil hemolítico apenas nos indivíduos com AF, sendo níveis de Hb plasmática 1,2 vezes menores no grupo de indivíduos com genótipos homocigoto mutante (4b4b). Assim, as diferentes relações dos marcadores bioquímicos e genéticos, com o perfil hemolítico e hipóxico dos indivíduos com AF e malária por *P. vivax*, evidenciam que as diferentes etiologias hemolíticas das doenças, devem ser consideradas para a caracterização do processo de hemólise. Por fim, os marcadores bioquímicos laboratoriais de hemólise, comumente adotados na rotina laboratorial para a caracterização do perfil hemolítico desses indivíduos, demonstraram ser importante biomarcadores para essas doenças.

Palavras-chave: doenças hemolíticas, malária por *Plasmodium vivax*, hemólise intravascular, marcadores genéticos.

ABSTRACT

Hemolysis, the process characterized by degradation of senescent or defective erythrocyte, may be established among the a physiopathological events in different diseases. Erythrocytes rupture and subsequent liberation of plasma hemoglobin (Hb) triggers events as hypoxia and declining of nitric oxide bioavailability (NO), which affect in the establishment of clinical manifestations in hemolytic diseases. Despite the distinct etiologies, the hemolysis process as occurs among the physiopathological events of sickle cell anemia (SCA), which is a hemolytic anemia characterized by chronic hemolysis and heterogenic phenotypes among individuals; as in *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), malaria a parasitosis which presents, during the disease intra-erythrocytic phase of the parasite cycle, events of acute hemolysis. Thus, the aim of this work was to evaluate the association of biochemical and genetic markers involved in hemolytic and hypoxia pathways, with the establishing the hemolytic profile of diseases with different hemolysis etiological patterns. The study group were formed by patients of both gender, divided in 300 individuals with SCA and 119 individuals with *P. vivax* malaria. The hemolytic profile of these individuals was established by hematological and hemolytic parameters, commonly employed in laboratorial routine. Relations among hemolysis markers, and these with the plasma hemoglobin levels (plasma Hb), used in this study as specific marker of intravascular hemolysis, and with HIF1A protein, used as hypoxia marker, were established as well. The genetic markers were investigated by association between the SNP rs7203560 from *NPRL3* gene, the VNTR rs61722009 (4a4b) and the SNP rs1799983 (894G>T) from *eNOS* gene, with the hemolytic profile, besides the association of SNP rs11549465 (1772C<T) from *HIF1A* gene, with the hypoxic profile. Results revealed different relations between markers for each study group: in individuals with SCA, despite hemolysis markers (Ret. Rel, Ret. Abs, LDH, AST and BI) were correlated among themselves, neither of them were related with plasmatic Hb levels. Positive correlations were observed among LDH and other markers, being this enzyme the only correlated, although negatively, with the HIF1A values. For individuals with malaria, hemolytic markers (AST and BI) were not correlated among themselves, but with plasmatic Hb, suggesting higher influence of intravascular hemolysis in the hemolytic profile from individuals of this study group. Regarding to the investigated mutations as genetic markers, only SNP rs1799983 (894G>T) from *eNOS* gene presented higher genotypic and allelic frequency, being the allele (T), as well as the mutant homozygote genotype

(TT), more frequent among individuals with SCA. This SNP was also related with the hemolytic profile in both study groups, when SCA and malaria individuals with genotypes GG and GT presented 1.3 times more plasma Hb. The VNTR rs61722009 (4a4b) mutation, also from *eNOS* gene, was related only with hemolytic profile of individuals with SCA, being the plasma Hb level 1.2 times lower in individuals with mutant homozygote genotype (4b4b). Thus, the different relations of biochemical and genetic markers, with hemolytic and hypoxic profiles of individuals with SCA and *P. vivax* malaria, evidence that the different hemolytic etiology diseases must be considered for the characterization of hemolysis process. That way, biochemical markers of hemolysis, commonly adopted in laboratorial routine for characterization of hemolytic profile from these individuals, demonstrated to be valuable biomarkers for these diseases.

Keywords: hemolytic diseases, *Plasmodium vivax* malaria, intravascular hemolyses, genetic markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hemólise intravascular e as respostas fisiológicas desencadeadas pela presença da Hb plasmática.....	27
Figura 2: Eventos fisiopatológicos relacionados a hemólise intravascular na anemia falciforme e consequências clínicas.....	30
Figura 3: Ciclo de vida do parasito <i>Plasmodium</i>	33
Figura 4: Análise comparativa das concentrações da proteína HIF1A e Hb plasmática entre os grupos de estudo.....	53
Figura 5: Correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia em indivíduos com AF.....	54
Figura 6: Correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia em indivíduos com malária por <i>P. vivax</i>	55
Figura 7: APÊNDICE C - Perfil eletroforético do SNP rs7203560 (T/G) do gene <i>NPRL3</i>	99
Figura 8: APÊNDICE C - Perfil eletroforético do SNP 11549465 (1771 C/T) do gene <i>HIF1A</i>	100
Figura 9: APÊNDICE C - Perfil eletroforético do SNP rs1799983 (894G/T) do gene <i>eNOS</i>	102
Figura 10: APÊNDICE C - Perfil eletroforético da mutação VNRT rs61722009 (4a4b) do gene <i>eNOS</i>	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização do perfil hematológico e hemolítico dos indivíduos com anemia falciforme.....	51
Tabela 2: Caracterização do perfil hematológico e hemolítico dos indivíduos com malária	52
Tabela 3: Frequência genotípica das mutações: SNP rs7203560 (<i>NPRL3</i>), VNTR rs61722009 e SNP rs1799983 (<i>eNOS</i>) e o SNP rs11549465 (<i>HIF1A</i>).....	57
Tabela 4: Frequência alélica das mutações: SNP rs7203560 (<i>NPRL3</i>), VNTR rs61722009 e SNP rs1799983 (<i>eNOS</i>) e o SNP rs11549465 (<i>HIF1A</i>).....	58
Tabela 5: Relação do SNP rs1799983 (894G/T - <i>eNOS</i>) com os marcadores de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.....	59
Tabela 6: Relação da variante VNTR rs61722009 (4a4b - <i>eNOS</i>) com os marcadores de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.....	60
Tabela 7: Relação do SNP rs7203560 (<i>NPRL3</i>) com os marcadores de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.....	60
Tabela 8: Relação do SNP rs1799983 (894G/T- <i>eNOS</i>) com os marcadores de hemólise em indivíduos com malária.....	61
Tabela 9: Relação da VNTR rs61722009 (4a4b - <i>eNOS</i>) com os marcadores de hemólise em indivíduos com malária.....	61
Tabela 10: Relação do SNP rs11549465 (1772C/T- <i>HIF1A</i>) com a proteína HIF1A em indivíduos com anemia falciforme e malária.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: APÊNDICE B: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, enzima e padrão de digestão utilizados na análise molecular (PCR-RFLP) para identificação da mutação de Hb S.....**95**

Quadro 2: APÊNDICE C: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e padrões de digestão utilizados na análise molecular (PCR-RFLP) para identificação do SNP rs7203560 (*NPRL3*), VNTR rs61722009 e SNP rs1799983 (*eNOS*) e o SNP rs11549465 (*HIF1A*).....**97**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AST	Aspartato aminotransferase
BI	Bilirrubina indireta
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino-tetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Epo	Eritropoetina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GWAS	Estudos de Associação de Genomas Amplos
G6PD	Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb F	hemoglobina fetal
Hb S	hemoglobina S (falcêmica)
Hb SS	homozigoto para a Hb S (anemia falciforme)
Hb	Hemoglobina
HCM	hemoglobina corpuscular média
Hp	Haptoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Hpx	Hemopexina
Ht	Hematócrito
HC	Hidroxibarbamida
ISSN	Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas
LDH	Lactato desidrogenase

LDH1	Lactato desidrogenase, isoforma 1
LDH2	Lactato desidrogenase, isoforma 2
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
NO	Óxido nítrico
pb	pares de base
PCR-RFLP	<i>Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
pH	Potencial hidrogênico
q.s.p	Quantidade suficiente para
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEB	Tris-EDTA-Borato
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. ERITOPOIESE	24
1.2. HEMÓLISE	25
1.2.1. Hipóxia e homeostase endotelial	26
1.2.2 Marcadores de hemólise	29
1.3. ANEMIA FALCIFORME	30
1.4. MALÁRIA POR <i>PLASMODIUM VIVAX</i>	32
1.5. VARIANTES GENÉTICAS	36
<i>Hypoxia-inducible factor (HIF)</i>	36
<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)</i>	37
<i>Nitrogen Permease Regulator-Like 3 (NPRL3)</i>	37
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Definição dos grupos de estudo	42
3.2. Casuística	42
3.3. Considerações éticas	44
3.4. Testes experimentais	44
3.4.1. Perfil hemoglobínico e diagnóstico de AF	45
3.4.2. Caracterização do perfil hemolítico e hipóxico	47
3.4.3. Análise das variantes genéticas	48
3.5. Análise estatística	48
4. RESULTADOS	51
4.1. Caracterização dos índices hematológicos e perfil de hemólise	51
4.2. Comparação das taxas de hemólise intravascular e de hipóxia entre os grupos de estudo, e a correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia	53
4.4. Frequência genotípica e alélica das mutações avaliadas	57
4.5 Associação das mutações com o perfil hemolítico	60
5.6. Associação do SNP 1722 C/T do gene <i>HIF1A</i> com a hipóxia	63
6. DISCUSSÃO	65
6.1 Perfil hemolítico e marcadores de hemólise	65
6.2. Hemólise intravascular e hipóxia	69
6.3. Variantes genéticas e marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia	71

7. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	89
APÊNDICE A – Testes clássicos para caracterização do perfil hemoglobínico.....	89
APÊNDICE B – Análise molecular para confirmação do diagnóstico de anemia falciforme.....	93
APÊNDICE C- Rastreamento das variantes genéticas dos genes <i>NPRL3</i> , <i>eNOS</i> e <i>HIF1A</i>	97
APÊNDICE D – Artigo científico submetido à revista <i>International Journal of Laboratory Hematology</i> . ISSN: 1751-553X.	104
APÊNDICE E – Short communication à ser submetido à revista <i>Hemoglobin</i>	119
ANEXOS	129
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética – CEP Hemorio	129
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética – CEP IBILCE/UNESP.....	130
ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética – Instituto Evandro Chagas	132

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ERITROIPOIESE

As células tronco hematopoiéticas (CTH) localizadas na medula óssea vermelha, por meio dos processos de proliferação, diferenciação e maturação celular, dão origem as células progenitoras responsáveis pela formação de células-mãe hematopoiéticas (cerca de 99% da medula óssea) (TESTA; DEXTER, 1989). As células-mãe hematopoiéticas, por sua vez, têm a capacidade de se diferenciarem em todas as linhagens celulares sanguíneas maduras, dentre elas, os eritrócitos. O processo regulado de produção de eritrócitos é denominado eritropoiese e ocorre por meio da maturação dos precursores eritróides (Unidades Formadoras de Colônias Eritróides, UFC-E), processo esse caracterizado pela diminuição da capacidade celular proliferativa, alterações morfológicas e altas taxas de síntese de hemoglobina (Hb), o principal transportador de oxigênio no sangue. Diferentes citocinas estimulam a eritropoiese, sendo a Eritropoetina (EPO) uma das mais importantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SANKARAN; WEISS, 2015).

Os eritrócitos dos mamíferos são células pequenas e anucleadas com grande quantidade de Hb (~ 5 mM). A anucleação ocorre durante a maturação dos eritrócitos, na medula óssea, como consequência da condensação gradual da cromatina que é expelida da célula ao mesmo tempo em que a concentração de Hb aumenta (JI et al., 2011). Por esta razão, os eritrócitos perdem gradualmente a capacidade de renovar suas moléculas, apresentando meia-vida de aproximadamente 120 dias. Dessa forma, as enzimas que controlam as atividades metabólicas da célula, atingem níveis críticos, contribuindo para a senescência eritrocitária com consequente eriptose e retirada dessas células da circulação por macrófagos, principalmente no baço (GUYTON; HALL, 2006).

Os componentes da Hb (heme e globinas) resultantes da degradação eritrocitária, terão destinos distintos, sendo os aminoácidos reaproveitados para síntese de novas cadeias globínicas, o ferro captado e utilizado para formação de novas moléculas heme, enquanto outras moléculas, como a protoporfirina, serão degradadas. Assim, é evidente que o processo de destruição de eritrócitos senescentes é essencial para renovação celular. A cada dia um indivíduo adulto tem cerca de 1% de eritrócitos destruídos, sendo essa perda compensada pelo lançamento de eritrócitos jovens (reticulócitos) na corrente sanguínea (GUYTON; HALL, 2006; KIM ; NEMETH, 2015). Entretanto, quando essa

relação entre destruição e síntese eritrocitária não ocorre de modo satisfatório, eventos fisiopatológicos podem ser desencadeados, como o estabelecimento da anemia em consequência de maiores taxas de lise eritrocitária (BROADWAY-DUREN; KLASSEN, 2013).

1.2. HEMÓLISE

O processo de destruição e remoção de eritrócitos senescentes e defeituosos da corrente sanguínea, é denominado hemólise. Embora possa ser um processo fisiológico assintomático, quando a destruição dos eritrócitos ocorre de forma prematura, e em proporções suficientes para provocarem a diminuição da Hb circulante, estabelece-se a anemia hemolítica. Nessas condições, a destruição eritrocitária pode ocorrer devido a diferentes causas, sejam elas de natureza mecânica, química, autoimune ou qualquer outra que diminua o tempo de vida dessa célula (BARCELLINI; FATTIZZO, 2015). De acordo com as diferentes origens, as anemias hemolíticas podem ser classificadas em: hereditárias, como as hemoglobinopatias (doença falciforme, talassemias); enzimopatias (deficiência de G6PD); membranopatias (esferocitose e eliptocitose); e adquiridas, as quais são classificadas em auto-imune, imune (após evento transfusional e/ou gestacional) e não imune (microangiopática, lesão celular como exemplo, a infecção por malária) (BROADWAY-DUREN; KLASSEN, 2013).

Embora seja um processo fisiopatológico com similaridades entre diferentes doenças, a hemólise pode desencadear consequências distintas de acordo a etiologia da destruição eritrocitária (KATO; TAYLOR, 2010). O processo hemolítico pode ser estabelecido de modo secundário como consequência de doenças hematológicas e não hematológicas, ou ocorrer de modo fisiopatológico, ou seja, um subfenótipo, sendo clinicamente categorizada em crônica ou aguda (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

A hemólise pode ainda ser diferenciada de acordo com os mecanismos e o local onde ocorrem, sendo: i) hemólise intravascular, quando a ruptura do eritrócito ocorre no interior dos vasos sanguíneos, com consequente extravasamento do conteúdo intracelular no plasma; e ii) hemólise extravascular, caracterizada pela retirada dos eritrócitos da corrente sanguínea, por meio de células que constituem o sistema reticuloendotelial, especialmente no fígado e no baço. Ambos os mecanismos, quando em condições patológicas, contribuem para o estabelecimento de eventos clínicos específicos (KATO;

TAYLOR, 2010; RAPIDO, 2017). Entretanto, diversos estudos objetivam a investigação da hemólise intravascular (HI) como importante mecanismo relacionado a complicações clínicas em doenças (ROTHER et al., 2005, AKINOSOGLU; SOLOMOU; GOGOS, 2012; CONRAN, 2014; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

1.2.1 Hipóxia e homeostase endotelial.

A quantidade total de eritrócitos humanos circulantes é regulada, de modo a garantir um número adequado de células capazes de oferecer o transporte de oxigênio suficiente aos tecidos. Quando em meio oxigenado e hidratado, o eritrócito possui a forma de disco bicôncavo, que proporciona maior superfície em relação ao volume, facilitando as trocas gasosas e permitindo maior flexibilidade ao passar por capilares mais finos, onde sofrem deformações temporárias e não se rompem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Assim, a manutenção das concentrações de oxigênio é essencial para homeostase celular e funcional eritrocitária (GUYTON & HALL, 2006).

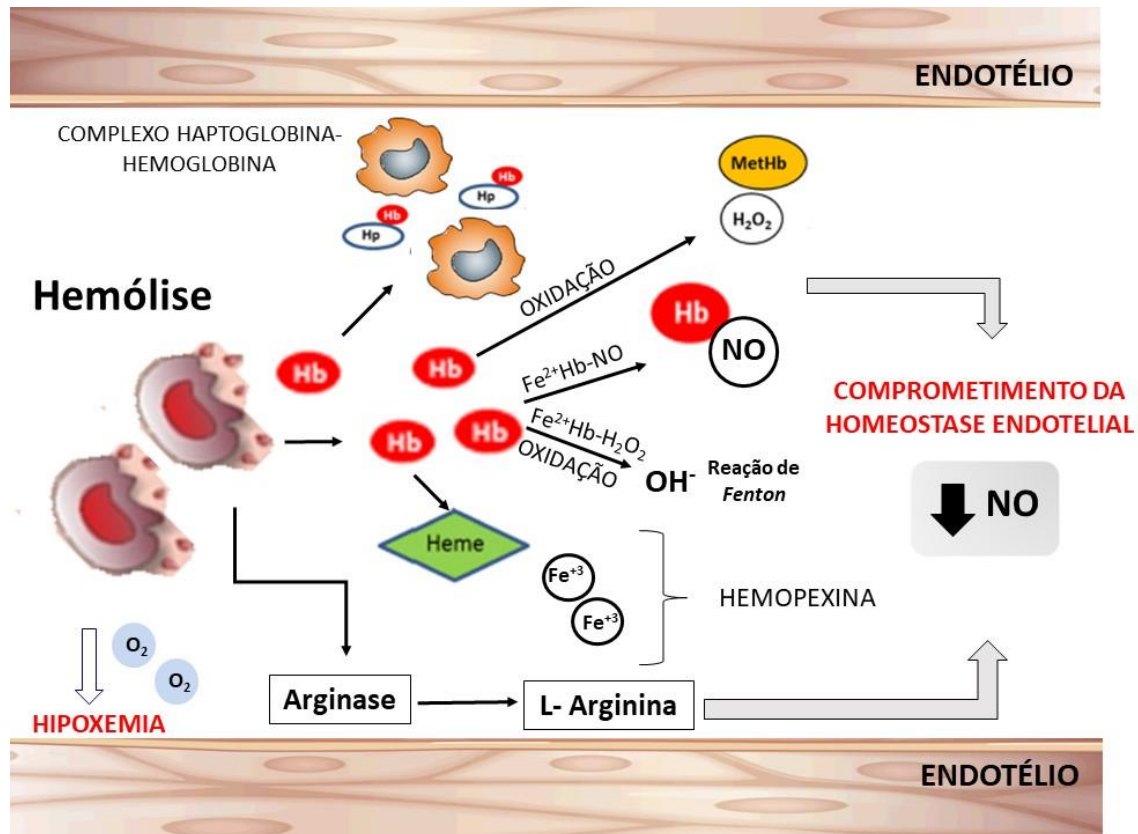
A ruptura do eritrocitário, com a consequente diminuição da concentração de Hb circulante, ocasiona a diminuição das concentrações de oxigênio (O_2) disponíveis na circulação. Essa condição, caracterizada pela baixa concentração de O_2 nas células e tecidos, é denominada hipoxemia e compromete a integridade desses sistemas (SUN; XIA, 2013; CABOOT; ALLEN, 2014). A hipóxia é ainda capaz de participar de mecanismos de regulação envolvidos em processos fisiopatológicos como angiogênese e inflamação (SEMENZA, 2012), que podem estar relacionados ao estabelecimento de manifestações clínicas nas doenças hemolíticas.

A resposta primária frente à ruptura do eritrócito é a liberação do conteúdo intraeritrocitário na corrente sanguínea, sendo a Hb (grupamento heme e globinas) as principais moléculas liberadas no meio extracelular (ROTHER et al., 2005). O complexo haptoglobina-hemopexina, mecanismo protetor, está prontamente disponível, para garantir a depleção das moléculas de Hb plasmática e de heme livre. Entretanto, quando a capacidade de depleção e detoxificação é excedida, devido ao excesso de liberação dessas moléculas, é desencadeado o efeito tóxico. Esse processo resulta em diferentes respostas fisiopatológicas, como a oxidação da molécula de Hb, formação de metahemoglobina e moléculas de ferro heme (Fe^{+3}), além da diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Figura 1) (SCHAER et al., 2013).

Na forma livre e em estado de valência ferroso, o ferro ligado a Hb está prontamente disponível para participar de reações redox (reações de Fenton), além de se ligarem ao NO por meio do complexo estável $\text{Fe}^{2+}\text{Hb-NO}$, contribuindo para o estabelecimento do estresse oxidativo e depleção de ON (BELCHER et al., 2010; GLADWIN; KANIAS; KIM-SHAPIRO, 2012). A diminuição da biodisponibilidade de NO é ainda agravada pela liberação de arginase durante a ruptura do eritrócito, uma enzima que atua degradando a L-arginina, substrato essencial para síntese desse gás. Em meio as moléculas que atuam na homeostase vascular, o NO é o gás mais importante, sendo considerado um vasodilatador endógeno (REITER et al., 2002; ROTHER et al., 2005). Esse gás é sintetizado nas células endoteliais, as principais formadoras do tecido endotelial, o qual é considerado um dos maiores tecidos do corpo humano. Como o endotélio vascular desempenha papel fundamental na homeostase tecidual, por exemplo atuando na manutenção da temperatura e do pH, além de ser uma importante barreira entre o sistema vascular e os tecidos, danos nas células endoteliais comprometem a homeostase endotelial, resultando em disfunções (MORRIS; GLADWIN; KATO, 2008; EELEN et al., 2015; BIERHANSL et al., 2017).

Dessa forma, podemos notar que a diminuição na biodisponibilidade de NO e a hipóxia, estão intimamente relacionados à hemólise intravascular (Figura 1), contribuindo para o estabelecimento de eventos fisiopatológicos, como aumento de moléculas pró-inflamatórias e de agregação, estresse oxidativo e disfunções endoteliais, eventos esses que contribuem de modo significativo com o estabelecimento de manifestações clínicas (HALDAR et al., 2007; KATO; TAYLOR, 2010; GLADWIN; KANIAS; KIM-SHAPIRO, 2012; RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2015; BARBER et al., 2016).

Figura 1: Hemólise intravascular e as respostas fisiológicas desencadeadas pela presença da Hb plasmática.



A Hb plasmática liberada durante a hemólise intravascular é rapidamente recrutada pelo complexo de detoxificação haptoglobina-hemoglobina. As proteínas haptoglobina sequestram a Hb livre, sendo todo o complexo endocitado por macrófagos/monócitos. Parte da Hb plasmática ainda sofre oxidação (metahemoglobina), liberando moléculas de ferro sérico (Fe³⁺), o qual é recrutado pela proteína hemopexina e degradado por hepatócitos (fígado). Quando ainda em excesso, a Hb plasmática liga-se ao NO, provocando a depleção desse gás e conseqüentemente, o comprometimento da homeostase endotelial. Ainda, a liberação da enzima arginase durante o rompimento dos eritrócitos, degrada o substrato (L-arginina) precursor da síntese de NO, limitando ainda mais sua biodisponibilidade e favorecendo disfunções endoteliais. A diminuição na concentração de O₂ circulante ocasionada pela ruptura dos eritrócitos e conseqüente extravasamento do grupamento heme, compromete a integridade dos órgãos e tecidos. *Elaborada pelo autor.* (ROTHER et al., 2005; KATO; TAYLOR, 2010; GLADWIN; KANIAS; KIM-SHAPIO, 2012)

1.2.2 Marcadores de hemólise

O diagnóstico de hemólise é realizado por meio da avaliação de parâmetros laboratoriais, os quais desempenham papel de biomarcadores. Entre eles destacam-se a contagem de reticulócitos (valores percentuais e absolutos), dosagem das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) e dos níveis de bilirrubina indireta (BI), também conhecida como bilirrubina não conjugada (HEBBEL, 2011; STOJANOVIC; LIONNET, 2016), variavelmente alterados frente às diferentes etiologias do processo hemolítico (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

Os parâmetros laboratoriais adotados como marcadores de hemólise, são resultados diretos e indiretos dos processos fisiológicos decorrentes da destruição eritrocitária. Os reticulócitos são eritrócitos imaturos utilizados como bons indicadores da resposta medular. Quando produzidos em maiores quantidades e liberados precocemente na corrente sanguínea, caracterizam a resposta eritropoiética compensatória devido à ocorrência de hemólise (BARCELLINI; FATIIZZO, 2015). Quanto às enzimas, a AST desempenha papel na transaminação de aminoácidos nas células, e atua como um importante marcador de danos teciduais, principalmente no tecido hepático (LEHNINGER; COX, 2006; VOET; VOET, 2006); a LDH está presente no interior dos eritrócitos em duas de suas cinco isoformas (LDH 1 e LDH 2), e são liberadas no meio extracelular quando ocorre a ruptura dessas células (STOJANOVIC ; LIONNET, 2016). Por fim, a BI é resultado da degradação do grupamento heme pela ação da enzima heme oxigenase. Nesta reação, os produtos da oxigenação e o NADPH, com seu poder redutor, liberam Fe^{+2} , monóxido de carbono (CO) e biliverdina (molécula antioxidante), que sofrerá redução por meio da enzima biliverdina redutase, originando a bilirrubina não conjugada, a qual é quantificada na forma de bilirrubina indireta (KRISTIANSEN et al., 2001; ROTHER et al., 2005; RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2014). Entretanto, com as relevantes pesquisas sugerindo a hemólise intravascular (HI) como fator determinante no agravamento clínico em doenças nas quais a hemólise está entre os eventos fisiopatológicos (ROTHER et al., 2005; CONRAN; ALMEIDA, 2014), a busca por marcadores isolados de HI têm sido o foco desses estudos. Apesar da LDH ser sugerida como o principal marcador de HI (HEBBEL, 2011; BALLAS, 2013), a avaliação dos níveis de Hb plasmática e/ou micropartículas resultantes de degradação eritrocitária, embora ainda menos utilizados, têm sido adotados

como marcadores específico de HI (NOURAIE et al., 2013; MILTON et al., 2013) na avaliação do perfil hemolítico.

1.3. ANEMIA FALCIFORME

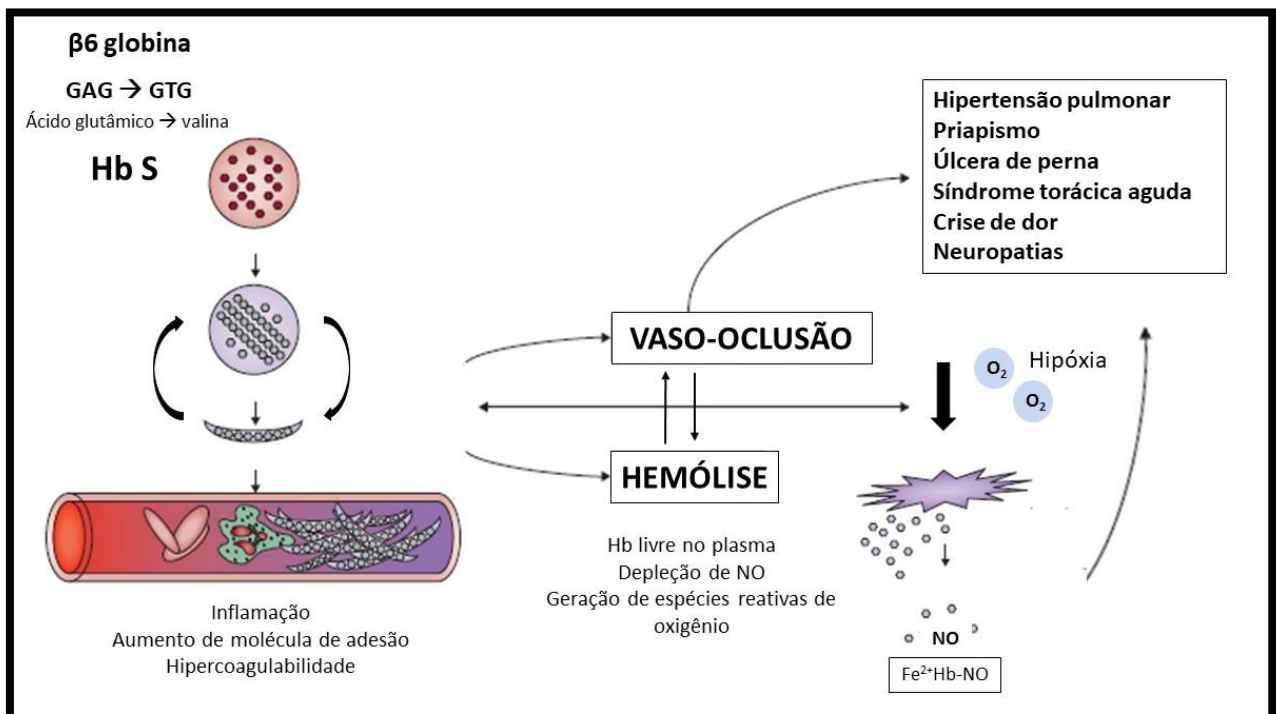
A anemia falciforme (AF), condição homocigota para a HbS, é uma afecção genética de clínica grave, caracterizada por indivíduos com fenótipos heterogêneos e complexos (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2007; NGO; STEINBERG, 2015), considerada uma das afecções monogênicas mais conhecidas e estudadas em todo mundo. De acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (WHO), estimativas mundiais revelam que cerca de 270 milhões de pessoas possuem os genes responsáveis por hemoglobinas anormais, sendo, que aproximadamente 80% das crianças nascidas a cada ano com diagnóstico de hemoglobinopatias, apresentam diagnóstico de AF (MODELL; DARLISON, 2008; SIMÕES et al., 2010). No Brasil, o número de pessoas com a doença falciforme, ou seja, aqueles que apresentam um alelo para Hb S, é estimado em 2 milhões, sendo mais de 30.000 com AF, o que reflete no nascimento de aproximadamente de 3500 crianças por ano (CANÇADO; JESUS, 2007; LOBO et al., 2014).

A molécula de Hb S é resultado da alteração estrutural na formação da cadeia beta globina em decorrência de uma mutação pontual do tipo transversão ($GAG \rightarrow GTG$) no códon que determina o sexto aminoácido (*HBB*:c. 20A>T - rs334). A mutação ocasiona a substituição do ácido glutâmico por uma valina na cadeia polipeptídica, originando uma Hb com características físicas e bioquímicas alteradas (STEINBERG, 1998; STEINBERG, 2009). Embora a Hb S possua capacidade normal de ligação ao oxigênio, a característica hidrofóbica resultante da mutação, desencadeia a polimerização desta Hb sob condições de hipóxia, desidratação e acidose (WEATHERALL et al., 2005; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Recorrentes ciclos de polimerização da molécula de Hb S dentro do eritrócito, dão início a uma cascata de eventos fisiopatológicos, como, a hemólise e a vaso-oclusão, sugeridas como responsáveis por favorecer processos inflamatórios, aumento de moléculas de adesão, de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, conseqüente estresse oxidativo (MORRIS, 2011; KATO; TAYLOR, 2010; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Além de intimamente relacionados, esses eventos desempenham papel importante no estabelecimento da condição de anemia hemolítica, hipóxia e danos

endoteliais, estando estes, por sua vez, associados com complicações clínicas da doença, como a síndrome torácica aguda (STA), úlcera de membros inferiores, priapismo e vasculopatias (Figura 2) (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2007; SUN; XIA, 2013; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; KATO, 2015).

Figura 2: Eventos fisiopatológicos relacionados a hemólise intravascular na anemia falciforme e consequências clínicas



No esquema podemos observar a polimerização da Hb S com consequente falcização eritrocitária como processo primário no desencadeamento de eventos fisiopatológicos. A hemólise e a vaso-oclusão são dois mecanismos intimamente relacionados. Com a hemólise e a liberação de Hb plasmática, ocorre a depleção de NO e consequente disfunção endotelial, que somada ao aumento da expressão de moléculas de adesão, inflamação e a vaso-oclusão, refletem os fenótipos clínicos da doença, como crises de dor e síndrome torácica aguda, entre outros. Os eventos fisiopatológicos, somados ao extravasamento do conteúdo intracelular, provocam diminuição na concentração de O₂ circulante favorecendo a hipóxia. (Adaptado de REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Embora as condições clínicas desencadeadas pelos eventos fisiopatológicos sejam características fenotípicas da doença (BALLAS, 2012), essas se manifestam de modo heterogêneo e com gravidade variável entre os indivíduos. Frente a essa complexidade fenotípica, a ocorrência de hemólise é um importante aspecto ser considerado quanto a variabilidade fisiopatológica e fenotípica (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Portanto, a avaliação do perfil hemolítico dos indivíduos com AF, é uma conduta importante durante a rotina clínica, a fim de auxiliar na conduta clínico-laboratorial.

Além dos fatores ambientais que influenciam o perfil hemolítico desses indivíduos, como condições de normóxia/hipóxia e níveis de hidratação, fatores genéticos também merecem ser considerados. Os níveis de Hb F e a coerança com alfa talassemia são moduladores genéticos com efeito protetor para os indivíduos Hb SS, garantindo na maioria dos casos, menos complicações clínicas (STEINBERG, 2005; STEINBERG, 2009; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). As taxas de hemólise na AF são constantes, mas heterogênea entre os indivíduos, muitas vezes reflexo dos moduladores genéticos de gravidade descritos acima (TAYLOR et al., 2008). Assim, o estabelecimento do perfil hemolítico, assim como a presença de moduladores que afetam o processo de hemólise, devem ser considerados para conduta clínica desses indivíduos.

1.4. MALÁRIA POR *PLASMODIUM VIVAX*

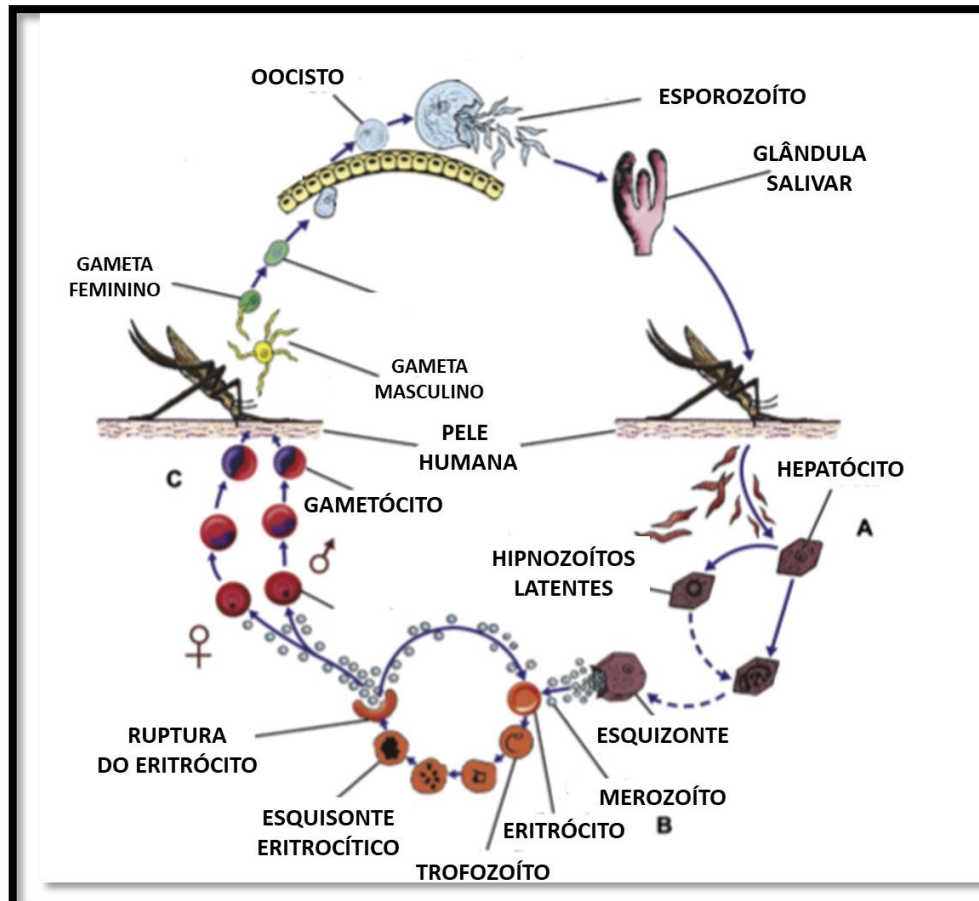
A malária humana é considerada a doença parasitária mais importante em todo o mundo por estar relacionada com as maiores causas de morbidade e mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais (QUINTERO et al., 2011; RAPOSO et al., 2013; WHO, 2016). Uma infecção de manifestação principalmente aguda, a malária humana é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Atualmente, são conhecidas seis espécies de parasitos que infectam o homem; o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium*, esse último observado como parasito humano apenas em experimentos *in vitro*, até o momento (MOYES et al., 2014; BRASIL et al., 2017).

Quase metade dos casos de malária da América Latina ocorrem em território brasileiro, consequência da infecção de apenas quatro espécies de parasitos: *P.falciparum*, *P.vivax* e *P. malariae* e *P. simium*, sendo os dois primeiros os mais prevalentes e associados aos maiores índices de mortalidade/virulência e disseminação (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; SIVEP-MALÁRIA, 2017). Entre os casos

positivos, aproximadamente 99,0% estão distribuídos na região Amazônica, área endêmica e de alta transmissão, com prevalência de aproximadamente 88,0% dos casos resultados de infecção por *P. vivax* (ANDRADE et al., 2010; AREVALO-HERRERA et al., 2012; RAPOSO et al., 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o *P. vivax* representa um problema mundial para a saúde pública e, somente no ano de 2017, foi a causa de aproximadamente 8850,00 mil de casos e mais de 3100 óbitos (WHO, 2016; WHO 2017).

O ciclo de vida dos parasitos causadores da malária humana é similar entre as espécies (ciclo heteroxênico), no qual o homem é o hospedeiro intermediário (fase assexuada) e fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* são hospedeiros definitivos (ciclo sexuado). O ciclo pode ainda ser dividido em fase pré-eritrocítica ou hepática, fase eritrocítica e fase esporogônica sexuada (TUTEJA, 2007). Durante a fase eritrocítica, os parasitos no estágio de merozoíto, hospedados no eritrócito, desenvolvem-se assexuadamente, provocando alteração da estabilidade e morfologia do eritrócito, e culminando na ruptura dessas células (Figura 3). É nessa fase hemolítica que os primeiros sintomas da doença começam a aparecer, em especial a cefaleia, febre e calafrios, além de sudorese e anemia (MILLER et al., 2002; ENGWERDA; GOOD, 2005; HOWES et al., 2016).

Figura 3: Ciclo de vida do parasito *Plasmodium*



A infecção no hospedeiro humano inicia-se quando a fêmea do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítos (formas infectantes do parasito), que entram na corrente sanguínea e atingem o fígado (fase pré-eritrocítica ou hepática - A). Durante a infecção dos hepatócitos, cada esporozoíto desenvolve-se em milhares de merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea após o rompimento dos hepatócitos, e infectam os eritrócitos, onde iniciam a multiplicação assexuada até o rompimento da célula (fase eritrocítica - B). No ciclo de vida do *P. vivax* os esporozoítos podem dar origem aos hipnozoítos, que permanecem latentes nos hepatócitos, desenvolvendo-se meses ou anos mais tarde. Por fim, para completar o ciclo de vida no hospedeiro humano, formas sexuais do parasito, denominadas gametócitos, desenvolvem-se, também dentro dos eritrócitos e, devido ao novo repasto sanguíneo pela fêmea do mosquito, perpetua o ciclo sexual no inseto. No estômago do mosquito, gametócitos se unem e geram zigotos os quais tornam-se móveis e alongados, denominando-se oocinetos. O zigoto, por sua vez, invade a parede do intestino médio do mosquito e se desenvolve em oocistos, crescendo até se romperem e liberam novos esporozoítos, que se estabelecem nas glândulas salivares do mosquito, onde estão disponíveis para inoculação em um novo hospedeiro. O ciclo é então reiniciado. *Adaptado de LÓPEZ et al., 2010.*

Complicações clínicas e mortalidade nos casos de infecção por *P. vivax* em áreas endêmicas, característica pouco comum dessa infecção num passado não muito distante, têm sugerido a malária por *P. vivax* como doença grave e até mesmo fatal (KOCHAR et al., 2009; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; LACERDA et al., 2012; BAIRD, 2013). Embora de fisiopatologia pouco conhecida, a progressão e o agravamento da malária por *P. vivax* estão associados principalmente ao estabelecimento de anemia intensa, muitas vezes consequente de episódios de hemólise acentuada. (ALEXANDRE et al., 2010; QUINTERO et al., 2011; DOUGLAS et al., 2012).

A ruptura dos eritrócitos devido a infecção parasitária prejudica o transporte de oxigênio, contribuindo para condição de hipoxemia, que é uma das alterações fisiológicas mais significativas no estabelecimento das consequências clínicas no hospedeiro (HALDAR et al., 2007; FENDEL et al., 2010). Somado a isso outros eventos fisiopatológicos, desencadeados pela hemólise, como inflamação, estresse oxidativo e danos endoteliais, influenciam significativamente no estabelecimento das condições clínicas (CARVALHO et al., 2010; YEO et al., 2010; AKINOSOGLOU; SOLOMOU; GOGOS, 2012). Por esse motivo, quanto à classificação etiológica das anemias hemolíticas, essa parasitose é classificada como “anemia hemolítica adquirida” (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004; BROADWAY-DUREN; KLASSEN, 2013).

Devemos considerar que a gravidade clínica entre os indivíduos de áreas endêmicas pode ser complexa e com influência multifatorial. Entre essas está a participação de fatores genéticos, como a co-herança com hemoglobinopatias e a deficiência de G6PD (RAMOS-JÚNIOR et al., 2010; HEDRICK, 2011). Sendo assim, é importante a investigação dessas comorbidades nas casuísticas de malária por *P. vivax* de áreas endêmicas, uma vez que também podem ser fatores influenciadores na heterogeneidade fenotípica.

1.5. VARIANTES GENÉTICAS

Estudos de associação de genomas amplos (GWAS) mostram que os aspectos genéticos individuais e as diferentes características étnicas das populações, desempenham influência no perfil clínico de indivíduos que apresentam as mesmas afecções (CARDON; BELL, 2001; PENA et al., 2011; LETTRE, 2012).

Seja pela complexidade clínica e heterogeneidade fenotípica entre os indivíduos com AF, ou pela heterogeneidade da presença de anemia e complicações clínicas nos casos de malária por *P. vivax*, a investigação de fatores genéticos também deve ser considerada no estudo dessas condições (LOPÉZ et al., 2010; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012; HABARA; STEIMBERG, 2016). Como o processo de hemólise é uma condição comum entre a AF e a malária, a investigação de variantes genéticas de genes que expressam proteínas relacionadas ao processo hemolítico, propicia a busca por moduladores genéticos para essas doenças. Nesse contexto, elencamos alguns genes específicos descritos à seguir.

Hypoxia-inducible factor (HIF)

A hipoxemia está presente em ambas as doenças consideradas nesse estudo. As respostas celulares adaptativas desencadeadas pela diminuição das taxas de Hb circulante, podem influenciar no perfil hemolítico dos indivíduos, de acordo com a etiologia da hemólise.

A proteína HIF-1 pertence a uma família de fatores de transcrição, que desempenham papel importante na homeostase do oxigênio. Duas subunidades compõem essa proteína, HIF-1 α e HIF-1 β , que quando juntas, ativam a transcrição de genes relacionados com a proliferação e manutenção celular, com repostas inflamatórias e com o processo de angiogênese (ORTMANN; DRUKER; ROCHA, 2014).

A subunidade HIF-1 α é transcrita a partir do gene *HIF1A* localizado no locus gênico 14q21-24. A ativação transcricional dessa subunidade, devido sua alta sensibilidade pelo oxigênio, garante que essa proteína seja considerada um potencial marcador endógeno de hipóxia (TANIMOTO et al., 2003). Quando em condições de normóxia, a proteína HIF-1 α é rapidamente degradada, enquanto que em condições de hipóxia, a hidroxilação dessa subunidade é inibida, permitindo sua dimerização à subunidade HIF-1 β . A junção das duas subunidades, ativa então a transcrição de genes

que atuarão nos mecanismos de respostas celulares adaptativos frente à condição de hipóxia, além de ser uma proteína precursora na expressão de genes responsáveis pela síntese de moléculas vasoativas (ZEPEDA et al., 2013).

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) C1772T (rs11549465) localizado no *éxon* 12 do gene *HIF1A* já esteve relacionado com o aumento da atividade transcricional da HIF-1 α (BAHADORI et al., 2010), o que nos sugeri o papel dessa variante genética como potencial influenciadora na expressão gênica e no potencial de resposta hipóxia-dependente das células.

Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula com atividade vasodilatadora endógena, que desempenha papel importante na homeostase endotelial. Enzimas responsáveis pela síntese de ON são codificadas pelo gene *NOS*, que apresenta três isoformas: endotelial - *eNOS*, neuronal-*nNOS* e induzível-*iNOS*. A expressão do gene *eNOS*, localizado no cromossomo 7q35-36, ocorre principalmente no tecido endotelial e em menor proporção nos granulócitos, monócitos, linfócitos e eritrócitos, sendo, portanto, o gene responsável pela síntese da proteína precursora da síntese desse gás, no tecido sanguíneo (NISHANK, 2013; CORTESE-KROTT et al., 2012).

Em doenças as quais a hemólise intravascular está presente, os níveis de NO podem estar diminuídos devido a presença de Hb plasmática e consequente depleção desse gás. Entretanto, a presença de variantes genéticas do gene *eNOS* já foram relacionadas com a redução da síntese de ON, como a variante genética de repetição de número de cópias (VNRT) 4a4b (rs61722009 - uma sequência de repetições de 27 pares de base), localizado no intron 4. A presença dos genótipos 4a4a e 4a4b já estiveram associados à menores taxas de expressão gênica, em relação ao genótipo 4b4b (TSUKADA et al., 1998). A presença do SNP 894G>T (rs1799983) localizado no *éxon* 7, resultante da substituição do aminoácido glutamina por uma asparagina, embora não associado diretamente com a síntese proteica, na presença de ao menos um alelo mutante (genótipos GT e TT), pode favorecer a clivagem proteolítica diminuindo a biodisponibilidade de ON (TESAURO et al., 2000).

Nitrogen Permease Regulator-Like 3 (NPRL3)

As talassemias do tipo alfa, caracterizadas pela redução parcial ou total da síntese de cadeias do tipo alfa globina, quando coerdada com a AF (STEINBERG; SEBATICI, 2012) e com malária por *P. vivax* (ALLEN; O'DONNELL; ALEXANDER, 2010) garante aos indivíduos características fenotípicas mais brandas, com condições clínicas menos graves. Algumas variantes do gene *Nitrogen Permease Regulator-Like 3 (NPRL3)* foram indicadas como fatores genéticos que influenciam a expressão do *cluster alpha globínico (HBA1/HBA2)*, culminando em condição semelhante às observadas nas alfa talassemias (MILTON et al., 2013). O *NPRL3* é um dos três principais genes constitutivos do domínio *alpha globínico (RHBDL1, MPG e NPRL3)* em aves e mamíferos, os quais pertencem aos sítios regulatórios responsáveis pela expressão do *HBA1/HBA2* (HUGHES et al., 2005; IAROVAIA et al., 2014).

O estudo de Milton e cols (2013) mostrou associação do SNP rs7203560 (T/G) com menores índices hemolíticos em indivíduos com AF, sugerindo essa variante como um possível marcador genético de hemólise. Estudo com o SNP rs7203560 mostrou forte desequilíbrio de ligação com variantes genéticas localizadas na região intrônica do gene *NPRL3*, onde também estão os principais elementos regulatórios do *cluster HBA1/HBA2* (HS-48, HS-30 e HS-33) (BARRET et al., 2005). Milton e cols (2013) sugerem que o papel protetor dessa variante, bem como seu papel como modulador de hemólise, merece ser investigado em diferentes doenças com etiologias hemolíticas distintas.

Embora com etiologia distintas, a hemólise é um evento fisiopatológico comum entre as doenças abordadas nesse estudo. Frente aos estudos que evidenciam que a hemólise é um mecanismo relacionado com a gravidade clínica, a investigação da influência de parâmetros bioquímicos e genéticos no estabelecimento do perfil hemolítico nesses indivíduos, é válida e promissora na busca por moduladores nessas doenças. Além disso, relações singulares entre os marcadores bioquímicos e genéticos com os perfis hemolíticos, de acordo com a doença, poderão auxiliar no entendimento da variabilidade fenotípica e no direcionamento da conduta clínica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a relação de marcadores genéticos e bioquímicos relacionados com as vias de hemólise e hipóxia em diferentes perfis etiológicos de hemólise, utilizando como modelos indivíduos com malária por *P. vivax* e anemia falciforme.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar o perfil hemolítico dos grupos de estudo a partir de parâmetros hematológicos e marcadores bioquímicos de hemólise;
2. Quantificar e comparar os níveis de hemólise intravascular e hipóxia em ambos os grupos de estudo;
3. Avaliar a correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia;
4. Rastrear variantes genéticas dos genes *HIF1A*, *eNOS* e *NPRL3*, e avaliar comparativamente, as frequências alélicas e genotípicas entre os dois grupos estudados;
5. Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos sobre os perfis hemolítico e hipóxico dos grupos estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Definição dos grupos de estudo

A casuística deste projeto foi dividida em dois grupos de estudo, classificados de acordo com a etiologia da hemólise. O primeiro grupo foi composto por indivíduos com diagnóstico de AF, uma anemia hemolítica consequente de alterações bioquímicas e físicas nos eritrócitos, diminuindo o tempo de vida dessas células, e o estabelecimento de hemólise crônica. A coleta das amostras foi realizada de modo ativo, por meio de visitas semestrais ao hospital em que os pacientes realizam acompanhamento clínico. O segundo grupo foi constituído por indivíduos com malária por *P. vivax*, uma parasitose na qual o alvo são os eritrócitos (reticulócitos), ocasionando a ruptura dos mesmos e culminando em hemólise aguda. A obtenção dessas amostras foi realizada por meio de coleta passiva, ou seja, de indivíduos que buscaram atendimento no posto de notificação de malária, frente a presença dos sintomas clínicos da doença. Assim, uma vez que as manifestações clínicas surgem durante a fase eritrocítica do ciclo do parasito, podemos inferir que a hemólise esteve presente entre os eventos fisiopatológicos no momento da coleta das amostras.

3.2. Casuística

Anemia falciforme

O grupo de estudo foi composto por 300 indivíduos com AF com idade mediana de 23 anos (mínimo de 11 e máximo de 72 anos) e sem distinção de gênero (162 mulheres e 138 homens). Todos se encontravam em acompanhamento no HEMORIO – Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcante, no estado do Rio de Janeiro, o qual está localizado na região Sudeste brasileira. O HEMORIO possui colaboração com o Departamento de Saúde do Estado, sendo a instituição responsável pelo *screening* das hemoglobinopatias do Programa de Triagem Neonatal do estado, além do gerenciamento e tratamento dos indivíduos com DF. Critérios de inclusão foram adotados a fim de minimizar a influência de variáveis externas e permitir o estudo com indivíduos em estado estacionário da doença, sendo: indivíduos sem histórico de admissão hospitalar para tratamento de crises álgicas ou eventos vaso-oclusivos há menos de quatro semanas da

data da coleta; ausência de transfusão sanguínea a menos de 60 dias e com níveis de Hb A menores que 10%; ausência de histórico de doenças intercorrentes como infecções e inflamações, ausência de uso de anti-inflamatórios e antibióticos durante as quatro semanas anteriores à coleta de amostra (BALLAS, 2012). Apesar da nossa tentativa de evitar influências externas, durante a coleta das amostras, nos deparamos com uma quantidade significativa de indivíduos que faziam uso de Hidroxicarbamida (HC) por pelo menos seis meses. A HC é um agente citostático e único medicamento autorizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de indivíduos com AF. Afim de alcançar uma casuística significativa, consideramos a coleta das amostras que faziam uso de HC. Entretanto, o uso do medicamento está relacionado, na maioria dos casos, com o favorecimento significativo nas manifestações clínicas do indivíduo, seja na redução de crises vaso-oclusiva, ou no aumento dos níveis de Hb F, características que podem amenizar o quadro hemolítico (SERJEANT, 2014; MOREIRA et al., 2016). Assim, o uso de HC foi considerado durante o estudo, e essa covariável será melhor caracterizada adiante.

O Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP de São José do Rio Preto, onde foi realizada a pesquisa, possui convênio de colaboração didático-científica com o HEMORIO, formalizado pelo processo de número 000054/33/01/2012

Malária por P. vivax

O grupo de indivíduos com malária por *P. vivax* foi formado por 119 indivíduos adultos, sem distinção de gênero (86 homens e 33 mulheres), com idade mediana de 32 anos (mínimo de 18 e máximo de 60 anos). As amostras foram obtidas no município de Itaituba-PA, pertencente à Mesorregião do Sudoeste Paraense e localizado na região Norte brasileira (latitude 04°16'34" sul e a uma longitude 55°59'01" oeste), com população estimada em 98.523 habitantes (IBGE, 2017). No ano de 2017 foram notificados mais de 2122 casos de malária no município, dos quais cerca de 80% foram causados por *P. vivax*, relatados pelo boletim epidemiológico do SIVEP-Malária (Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária) (SIVEP-MALÁRIA, 2017). O Índice Parasitário Anual (IPA= Número de exames positivos de malária por local provável de infecção/População total residente no período determinado x 1000) para malária nos anos de 2015 e 2016, período no qual ocorreu a coleta das amostras, foi de 26,7 e 36,6 casos/mil

habitantes, respectivamente, caracterizando o município de Itaituba, como um local médio risco de transmissão de malária nesse período.

Para formação do grupo de estudo, após os testes de Gota Espessa e Nested PCR (SNOUNOU et al., 1992) para confirmação do diagnóstico, critérios de inclusão foram adotados, sendo selecionados: indivíduos com Gota espessa positiva para *P. vivax*, independente da quantificação da parasitemia; ser nativo da área de estudo; ausência de hemoglobinopatias (HbAA); ausência do uso de antimalárico nos 30 dias anteriores à coleta; ausência de doenças degenerativas, tuberculose e leishmanioses e infecção por helmintos.

3.3. Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) dos Institutos envolvidos com a pesquisa: HEMORIO – processo 000054/33/01/2012 (Anexo A), UNESP - parecer 948.491 (Anexo B) e Instituto Evando Chagas SVS/MS – parecer 654.999) (Anexo C), atendendo às normas vigentes no país. A coleta das amostras, sempre realizada por profissional habilitado, somente ocorreu após os indivíduos receberem esclarecimentos e manifestarem sua concordância em participar da pesquisa, por meio da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme estabelecido pela Resolução CNS 466/12. Os indivíduos participantes da pesquisa estiveram sujeitos a risco mínimo, com possibilidade de dor e hematoma no local da punção venosa decorrente da coleta da amostra.

Todas as informações fornecidas e os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram mantidos em sigilo, sendo divulgados apenas em reuniões e revistas científicas. A análise dos prontuários para obtenção dos dados clínicos utilizados no estudo, foi sempre acompanhada pelos clínicos responsáveis pelos pacientes.

3.4. Testes experimentais

Os testes experimentais foram desenvolvidos no LHGDH, do Departamento de Biologia sediado na “Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Campus de São José do Rio Preto, SP. Cada amostra de sangue total coletada foi armazenada em duas alíquotas, sendo uma destinada à caracterização do perfil hemoglobínico e extração de DNA para análises

moleculares, e outra centrifugada para obtenção do plasma, o qual permaneceu armazenado a -80°C para posterior quantificação das proteínas plasmáticas.

Somado aos testes experimentais, dados laboratoriais referentes a avaliações de parâmetros hematológicos e hemolíticos, foram obtidos a partir de análise de prontuários médicos e sistema hospitalar. Esses dados resultaram de análises laboratoriais realizadas durante a rotina clínica dos indivíduos que compuseram os grupos de estudo, no período em que ocorreram a coleta das amostras.

As metodologias utilizadas estão brevemente descritas abaixo.

3.4.1. Perfil hemoglobínico e diagnóstico de AF

As amostras foram submetidas aos testes laboratoriais clássicos para análise do perfil hemoglobínico, seguido de análises moleculares para diagnóstico de AF, quando sugerido. Os testes clássicos de diagnóstico estão descritos abaixo, cujos protocolos encontram-se no APÊNDICE A.

Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Análise do esfregaço sanguíneo a fresco no microscópio de luz (objetiva de 40x). A técnica é utilizada para avaliar o tamanho e forma dos eritrócitos, bem como a quantidade de hemoglobina no interior das células.

Resistência dos eritrócitos à hemólise (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Teste realizado em solução de NaCl 0,36% afim de avaliar a resistência dos eritrócitos. Quando normais, os eritrócitos sofrem hemólise nessa solução salina, enquanto eritrócitos microcíticos tendem a ser mais resistentes, apresentando resultados positivos ao teste. É um teste seletivo de talassemias, em que 97% das talassemias beta apresentam positividade nessa concentração.

Padrão de migração das hemoglobinas em eletroforese de pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965) e pH ácido (VELLA, 1968).

Hemolisados de sangue total, com saponina, foram submetidos à eletroforeses em tampão TRIS/EDTA/Borato (pH 8,6) em fitas de acetato celulose e em tampão FOSFATO (pH 6,2) em gel de ágar. Por meio dessas técnicas é possível identificar

hemoglobinas normais e parte das hemoglobinas anormais mais frequentes, por meio dos padrões de mobilidade eletroforética diferentes da Hb A. A realização da eletroforese em pH ácido é importante pois auxilia na diferenciação de hemoglobinas que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino.

Quantificação das frações de hemoglobinas por cromatografia líquida e alta performance (HPLC) – Equipamento Ultra 2 (Trinity Biotech).

Para essa análise foi utilizado o equipamento *Ultra 2* com o kit *Resolution* para quantificação das frações hemoglobínicas e identificação de hemoglobinas variantes. A técnica consiste na quantificação e caracterização das frações de Hb por meio dos padrões de absorvância *versus* tempos de retenção, em um sistema fechado de cromatografia líquida de troca iônica. Cada Hb tem um tempo de retenção característico que é expresso na forma de cromatogramas. Ao final da análise, uma cópia do cromatograma e os dados referentes ao perfil hemoglobínico, bem como as quantificações de cada fração hemoglobínica, são emitidos.

Os indivíduos com malária que apresentaram padrão anormal de hemoglobinas, foram excluídos do grupo. Os indivíduos o perfil hemoglobínico sugestivo de AF foram direcionados para as análises moleculares para confirmação do diagnóstico. Os testes realizados para o diagnóstico molecular de AF estão descritas a seguir, com protocolo detalhado no APÊNDICE B.

Extração de DNA (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989)

O DNA genômico utilizado nas análises moleculares foi obtido a partir de leucócitos de sangue periférico por meio da técnica de fenol-clorofórmio seguido de precipitação por etanol. A metodologia consiste na obtenção do ácido desoxirribonucleico por meio da desnaturação proteica, as quais ficam aderidas à fase orgânica da solução. O DNA, diluído na porção aquosa, sofre precipitação após adição de etanol, sendo facilmente separado por centrifugação. O material genético foi então ressuspensionado em solução aquosa sendo, posteriormente quantificado e qualificado, por análise em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000). Essa metodologia de obtenção de DNA foi escolhida pela ótima qualidade do produto final, adequado para aplicação de análises de biologia molecular. O protocolo na íntegra está descrito no APÊNDICE B.

PCR-RFLP para identificação de Hb S (SAIKI et al., 1985)

A identificação da mutação característica da Hb S, foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de análise de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), que se resume em amplificação do fragmento que contém a mutação, seguida de digestão enzimática e visualização em gel de agarose por meio da técnica de eletroforese. Os diferentes padrões de amplificação e digestão enzimática nos permitiu identificara presença do genótipo em homozigose para Hb S, ou seja, diagnóstico de AF.

3.4.2. Caracterização do perfil hemolítico e hipóxico*Parâmetros hematológicos e bioquímicos de hemólise*

Para caracterização do perfil hemolítico dos indivíduos dos grupos de estudo foram considerados parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos de hemólise comumente adotados na rotina laboratorial bem como a dosagem dos níveis de Hb plasmática.

Os parâmetros avaliados entre os indivíduos com AF foram obtidos por meio de análises a prontuários médicos e sistema hospitalar, a partir de visitas ao HEMORIO. Os parâmetros hematológicos considerados foram: Hb total (g/dL), GV (M/ μ L), Ht (%), VCM (fL) e HCM (pg), todos obtidos por equipamentos (Cell-Dyn Ruby), assim como os valores absolutos (Ret. Abs – K/ μ l) e percentuais (Ret. Rel - %) de reticulócitos. Quanto aos marcadores bioquímicos de hemólise, foram considerados os níveis enzimáticos de LDH e AST, quantificados por métodos enzimáticos (AU680 Chemistry System, Beckman Coulter Inc., Jersey, NJ, USA), e quantificação de Bil. Ind. obtida pelo método 2,4- diclorofenil diazonio (Beckman coulter AV680).

Para os indivíduos com malária, os parâmetros hematológicos considerados foram Hb total (g/dL), GV (M/ μ L), Ht (%), VCM (fL) e HCM (pg), também obtidos por equipamentos automatizados. Para esse grupo, os parâmetros bioquímicos de hemólise considerados foram os níveis enzimáticos de AST e os valores de Bil. Ind., ambos obtidos à partir da análise dos prontuários clínicos dos indivíduos.

Quantificação dos níveis plasmáticos das proteínas Hb livre e HIF1A

Para ambos os grupos as quantificações das proteínas Hb plasmática (*Hemoglobin Human ELISA Kit – ab157707*) e HIF1A (*HIF1A Human ELISA Kit – ThermoFisher scientific*), foram obtidos por ensaio de imunoabsorção enzimática, seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

3.4.3. Análise das variantes genéticas

Ambos os grupos de estudos foram genotipados para todas as mutações investigadas nesse estudo.

As análises moleculares para os SNP rs7203560 (gene *NPRL3*), rs1799983 (gene *eNOS*) e rs11549465 (gene *HIF1A*) foram realizados por meio da técnica de PCR-RFLP, enquanto que para a mutação VNTR rs61722009 (4a4b - gene *eNOS*), a identificação foi realizada por meio de PCR seguida de eletroforese e avaliação dos diferentes padrões de fragmentos amplificados, de acordo com o tamanho do alelo. Os oligonucleotídeos iniciadores, assim como os protocolos de amplificação e digestão enzimática estão descritos no APÊNDICE C.

3.5. Análise estatística

Os softwares utilizados para as análises dos dados foram o Statistica 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e GraphPad Prisma versão 5.01 para *Windows* (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Todos os dados foram avaliados quanto a normalidade e homocedasticidade por meio do *Normal Probability Plots of Residuals* e teste de *Levene*, respectivamente. Os parâmetros hematológicos e hemolíticos foram comparados entre os subgrupos estabelecidos dentro de cada grupo de estudo por meio de *General Linear Models (GLM)*. Esse modelo nos permitiu avaliar os dados por meio de combinações de variáveis dependentes (parâmetros avaliados) e variáveis categóricas (classificação dentro de cada grupo de estudo): uso e não uso de HC entre os indivíduos com AF; e homem e mulher entre os indivíduos com malária. Essa análise também nos permitiu adotar covariáveis, ou seja, variáveis que pudessem exercer influência nas variáveis avaliadas. O modelo de *GLM* também foi adotado para avaliar a associação das variantes genéticas com os perfis hemolíticos e de hipóxia, considerando as covariáveis idade,

gêneros, níveis de Hb F e uso ou não de HC para os indivíduos com AF, e idade e gênero para os indivíduos com malária. Para as análises de correlação entre parâmetros de hemólise e hipóxia foi aplicado teste de correlação de *Sperman* (dados não paramétricos). Por fim, para análise comparativa das frequências alélicas e genotípicas das variantes genéticas entre os grupos, foi aplicado os testes de *Qui-Quadrado* e *Exato de Fisher*. O valor de significância adotado foi em $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados a seguir estão sequencialmente apresentados, de acordo com os objetivos propostos. Entre as análises realizadas para obtenção desses resultados, o número amostral difere, devido à intercorrências nos processos analíticos.

4.1. Caracterização dos índices hematológicos e perfil de hemólise

Anemia falciforme

A caracterização hematológica e hemolítica do grupo de indivíduos com AF, está apresentada na Tabela 1. Como mencionado anteriormente, na composição do nosso grupo de estudo, alguns indivíduos faziam uso de HC. Considerando a possível influência do tratamento no estabelecimento do perfil hemolítico desses indivíduos, esse grupo de estudo foi inicialmente subdividido em: indivíduos que faziam uso de HC (HC+) e os que não faziam uso (HC-). Ainda é importante ressaltarmos que os valores de Hb F, idade e gênero, foram adotados como covariáveis, sendo corrigidas durante a comparação dos parâmetros

Os valores de GV, HCM, Ret. Rel, Ret. Abs, e das enzimas LDH e AST, estiveram significativamente diferentes entre os subgrupos. Assim, a fim de diminuir as variáveis externas capazes de influenciar as próximas análises, adotamos o uso ou não de HC como mais uma covariável a ser considerada.

Embora nem todos os parâmetros avaliados tenham sido diferentes entre os subgrupos, tanto os índices hematológicos como os marcadores de hemólise estiveram fora dos valores de normalidade, caracterizando a ocorrência de hemólise crônica na AF.

Tabela 1: Caracterização do perfil hematológico e hemolítico dos indivíduos com anemia falciforme.

Anemia falciforme			
	HC + N=67	HC - N= 172	p*
	Média (±E.P)	Média (±E.P)	
Idade**	23 (11 – 72)	23 (11 – 61)	-----
GV M/μL	2,40 (± 0,05)	2,60 (± 0,04)	0,010
Hb g/dL	8,26 (± 0,13)	8,20 (± 0,09)	0,838
Ht (%)	23,71 (± 0,53)	23,84 (± 0,51)	0,758
VCM (fL)	99,77 (± 1,54)	90,64 (± 0,78)	<0,001
HCM (pg)	34,70 (± 0,61)	31,94 (± 0,30)	<0,001
Ret. Rel (%)	8,85 (± 0,45)	10,09 (± 0,23)	0,020
Ret. Abs (K/μL)	191,74 (± 10,30)	263,30 (± 7,56)	<0,001
LDH (U/L)	438,65 (± 22,60)	701 (± 34,10)	<0,001
AST (U/L)	31,20 (± 1,30)	42,67 (± 1,46)	0,001
BI. (mm/dL)	2,50 (± 0,20)	2,65 (± 0,13)	0,633
Hb plasmática (g/dL)	0,008 (± 4,40)	0,01 (± 5,20)	0,568

EP: erro padrão; GV: glóbulos vermelhos; Hb: hemoglobina total; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média.

Valores de normalidade estimados com base no intervalo do menor e maior valores entre homens e mulheres.

GV (4,5 – 6,0); Hb (12,0 – 16,0); Ht (36,0 – 50,0); VCM (80,0 – 94,0); HCM (27,0 – 32,0).

Ret. Rel = reticulócitos relativos (porcentagem de reticulócitos); Ret. Abs = reticulócitos absolutos; LDH = enzima lactato desidrogenase; AST: enzima aspartato aminotransferase; Bil. Ind = bilirrubina indireta (bilirrubina não conjugada); Hb livre = hemoglobina plasmática.

Valores de referência: LDH (< 480 U/L); AST (< 31 U/L); ALT (<31 U/L); Bil. Ind. (< 0,7 mg/dL); Hb plasmática (0,005g/dL) (Steinberg et al., 2013).

M/μL: milhões por microlitro; g/dL: gramas por decilitro; fL: femtolitros; pg: picogramas; K/μL: mil por microlitros;

U/L: unidades por litro; mm/dL: miligramas por decilitros.

* A comparação dos dados foi realizada por modelo *GLM*, considerando $p < 0,05$ como significativo.

** Para o cálculo da idade foi utilizado mediana com mínimo-máximo

Malária por P. vivax

Para os indivíduos com diagnóstico de malária, os resultados estão apresentados na Tabela 2. Para a comparação dos parâmetros avaliados nesse grupo, os indivíduos foram inicialmente divididos quanto ao gênero, sendo formado os subgrupos homens *versus* mulheres. A idade foi adotada como covariável e corrigida durante a comparação dos dados.

Os valores de Hb, Ht, GV, Bil. Ind. e os níveis Hb plasmática, apresentaram diferença significativa entre os subgrupos, sugerindo que o gênero é mais uma importante covariável a ser considerada nas próximas análises.

Na avaliação hematológica, todos os índices estiveram dentro dos valores de normalidade, indicando a ausência de anemia estabelecida no momento da coleta da amostra. No entanto, entre os marcadores bioquímicos de hemólise, os valores AST

estiveram aumentados em ambos os subgrupos, mas em especial entre os indivíduos do sexo masculino, no qual também observamos valores aumentados de Bil. Ind. Esses resultados evidenciam a ocorrência de hemólise no momento da coleta das amostras. Os níveis de Hb plasmática, também maiores quando comparados ao valor de normalidade, foram maiores nos indivíduos do sexo masculino.

Tabela 2: Caracterização do perfil hematológico e hemolítico dos indivíduos com malária

Malária vivax				
	Total N=119	Homens* N=86	Mulheres* N=33	p*
	Média (±E.P)	Média (±E.P)	Média (±E.P)	
Idade**	32 (18 - 60)	31,5 (18 - 60)	33 (18 - 55)	-----
GV M/μL	4,80 (± 0,05)	4,87 (± 0,06)	4,35 (± 0,09)	<0,001
Hb g/dL	14,01 (± 0,16)	14,48 (± 0,18)	13,02 (± 0,28)	<0,001
Ht (%)	42,33 (± 0,48)	43,55 (± 0,53)	39,15 (± 0,84)	<0,001
VCM (fL)	89,36 (± 0,34)	89,40 (± 0,40)	89,25 (± 0,63)	0,934
HCM (pg)	29,9 (± 0,12)	29,77 (± 0,89)	30,07 (± 0,35)	0,225
AST (U/L)	35,86 (± 3,03)	37,58 (± 3,72)	31,36 (± 5,07)	0,380
BL (mm/dL)	0,64 (± 0,06)	0,73 (± 0,08)	0,40 (± 0,04)	0,015
Hb. plasmática (g/dL)	0,013 (± 5,52)	0,014 (± 6,28)	0,010 (± 9,06)	0,008

EP: erro padrão; GV: glóbulos vermelhos; Hb: hemoglobina total; Ht: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média..

Valores de normalidade estimados com base no intervalo do menor e maior valores entre homens e mulheres.

GV (4,5 – 6,0); Hb (12,0 – 16,0); Ht (36,0 – 50,0); VCM (80,0 – 94,0); HCM (27,0 – 32,0).

LDH = enzima lactato desidrogenase; AST: enzima aspartato aminotransferase; BI = bilirrubina indireta (bilirrubina não conjugada); Hb livre = hemoglobina plasmática.

Valores de referência: AST (< 31 U/L); Bil. Ind. (< 0,7 mg/dL). Hb plasmática (0,005g/dL) (Steinberg et al., 2013).

M/μL: milhões por microlitro; g/dL: gramas por decilitro; fL: femtolitros; pg: picogramas; U/L: unidades por litro; mm/dL: miligramas por decilitros.

*A comparação dos dados entre os subgrupos mulheres *versus* homens, foi realizada por modelo *GLM*, considerando $p < 0,05$ como significativo.

** Para o cálculo da idade foi utilizado mediana com mínimo-máximo

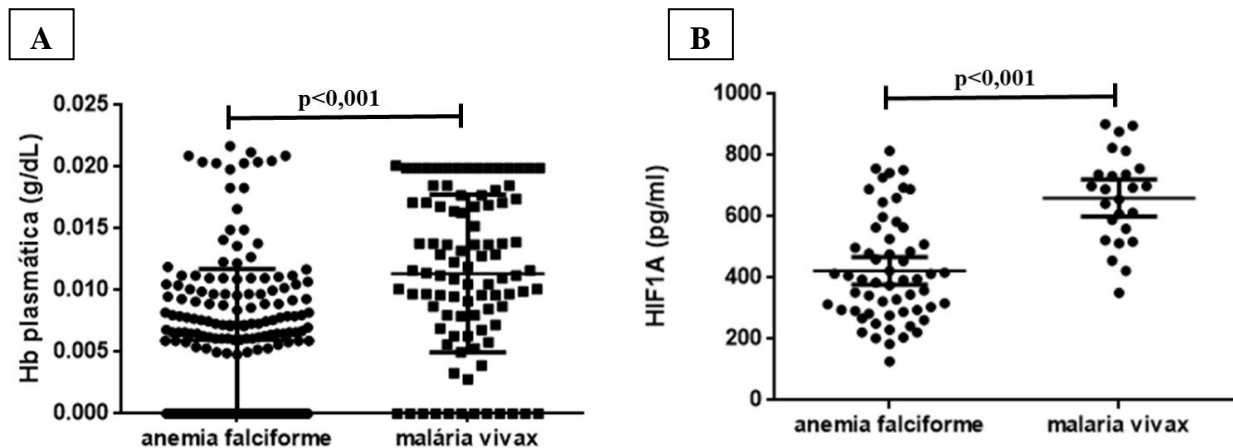
4.2 Comparação das taxas de hemólise intravascular e de hipóxia entre os grupos de estudo, e a correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia.

A fim de estudarmos as proteínas envolvidas em vias potenciais influenciadoras do perfil hemolítico, avaliamos a hemólise intravascular nos indivíduos com AF e malária, por meio da quantificação de Hb plasmática, bem como a hipóxia por meio da proteína HIF1A. As quantificações das proteínas foram significativamente diferentes entre os grupos (Figura 4), sugerindo respostas fisiológicas distintas de acordo com a etiologia e padrão da hemólise em cada condição clínica.

O grupo de indivíduos com malária apresentou níveis 1,7 vezes maiores de HIF1A (689,82±29,42 pg/mL), quando comparados ao com AF (393,49±22,60 pg/mL). Maiores

valores de Hb plasmática também foram observados nos indivíduos com malária ($0,013 \pm 0,0006$ g/dL na malária, e $0,009 \pm 0,0003$ g/dL na AF), caracterizando uma taxa de hemólise intravascular 1,4 vezes maior nesses indivíduos.

Figura 4: Análise comparativa das concentrações da proteína HIF1A e Hb plasmática entre os grupos de estudo



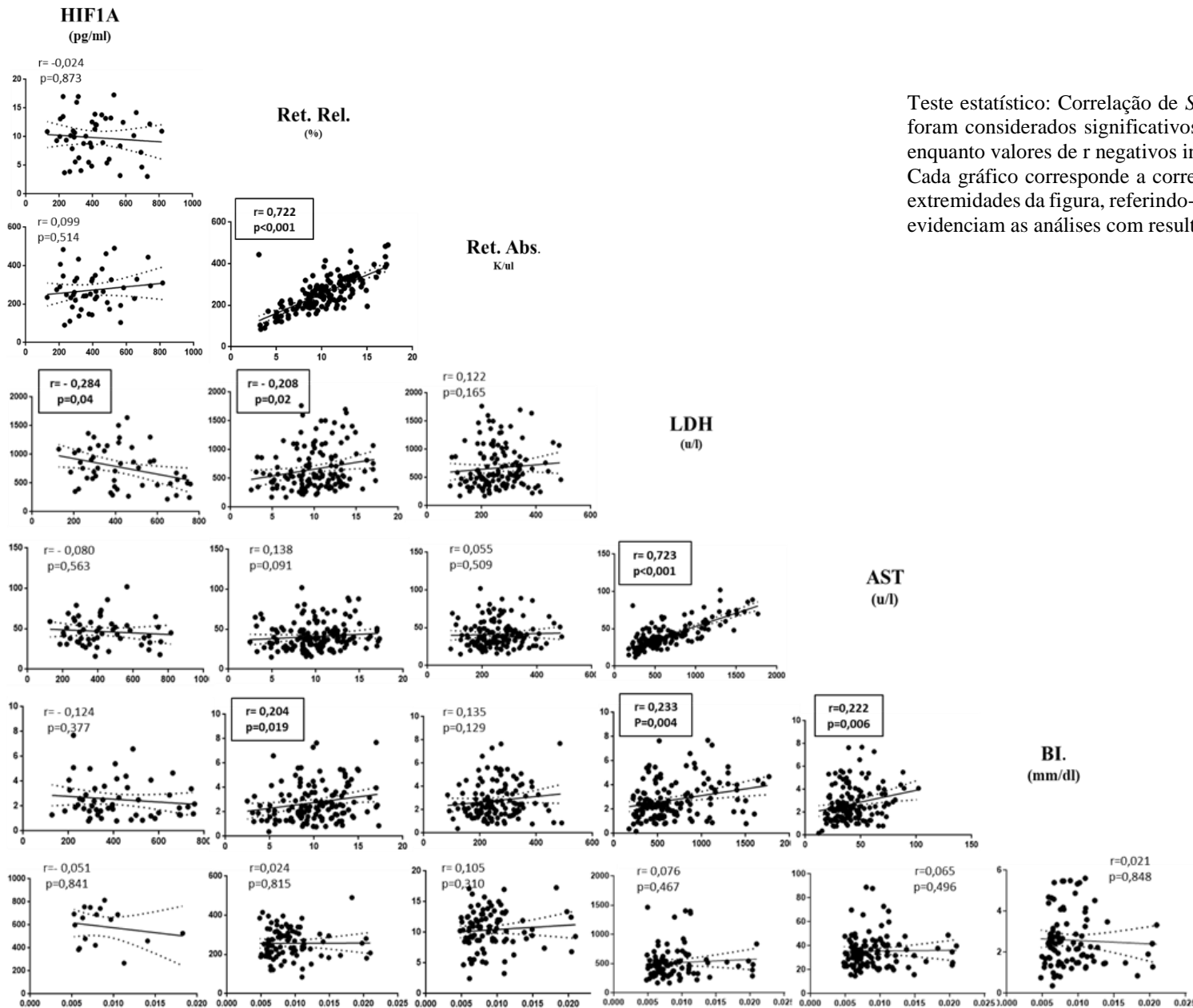
Teste estatístico: *General Linear Models (GLM)*, considerando idade, gênero e HC como covariáveis no grupo com AF e, idade e gênero para os indivíduos com malária. Valores de $p < 0,05$ como significativos. A) Comparação dos níveis de Hb plasmática, adotado como marcador específico de hemólise intravascular. B) Comparação dos valores da proteína HIF1A utilizado como marcador de hipóxia desse estudo. A análise de ambos os marcadores revelou maiores valores entre os indivíduos com diagnóstico de malária.

Dessa forma, a fim de avaliarmos a relação entre os marcadores bioquímicos de hemólise, adotados na rotina clínica desses indivíduos, com os níveis das proteínas Hb plasmática e HIF1A, realizamos o teste de correlação de *Spearman*. A análise foi realizada em ambos os grupos de estudo, separadamente, e estão descritas nos subitens seguintes.

Anemia falciforme

Nesse grupo de estudo foi observada correlações positivas entre os marcadores de hemólise: Ret. Rel. e Ret. Abs; Ret. Rel e Bil. Ind; LDH e AST; LDH e BI; AST e BI, e correlação negativa entre os valores de Ret. Rel e LDH. Nenhum dos marcadores de hemólise apresentou correlação com os níveis de Hb plasmática. Em relação ao marcador de hipóxia (HIF1A), apenas para os níveis de LDH houve correlação negativa. Os valores das correlações observadas estão apresentados na Figura 5.

Figura 5: Correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia em indivíduos com AF.



Teste estatístico: Correlação de *Spearman* (dados não paramétricos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Valores de r positivos indicam correlações positivas enquanto valores de r negativos indicam correlações negativas.

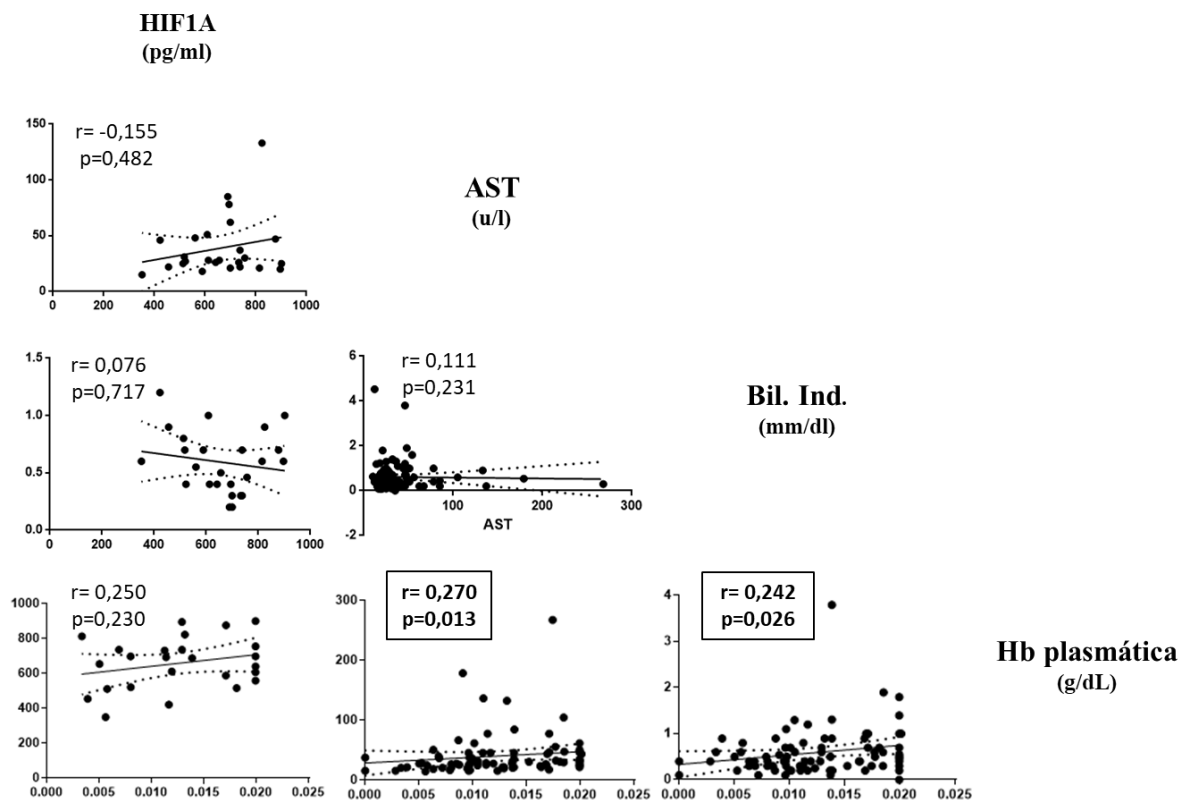
Cada gráfico corresponde a correlação entre duas variáveis, as quais estão descritas nas extremidades da figura, referindo-se aos eixos x e y. Os valores limitados por um retângulo evidenciam as análises com resultados significativos.

Hb plasmática (g/dL)

Malária por *P. vivax*

Nesse grupo de estudo obtivemos apenas as variáveis AST e BI como marcadores bioquímicos de hemólise a serem avaliados, e observamos correlação positiva de ambos com os níveis de Hb plasmática (Figura 6). Nenhum dos marcadores hemolíticos estiveram relacionados com os níveis de HIF1A.

Figura 6: Correlação entre os marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia em indivíduos com malária por *P. vivax*



Teste estatístico: Correlação de *Spearman* (dados não paramétricos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Valores de r positivos indicam correlações positivas enquanto valores de r negativos indicam correlações negativas. Cada gráfico corresponde a correlação entre duas variáveis, as quais estão descritas nas extremidades da figura, referindo-se aos eixos x e y. Os valores limitados por um retângulo evidenciam as análises com resultados significativos.

4.4. Frequência genotípica e alélica das mutações avaliadas.

Entre as variantes genéticas avaliadas nesse estudo, mutações em genes envolvidos com a expressão de proteínas atuantes em vias relacionadas com respostas fisiopatológicas da hemólise, foram considerados. Sendo assim, avaliamos o SNP rs7203560 (gene *NPRL3*), localizado próximo a região regulatória do *cluster* alfa globínico; a mutação de repetição rs61722009 (4a4b do gene *eNOS*) e o SNP rs1799983 (894 G>T do gene *eNOS*), relacionado com a síntese do NO e manutenção da homeostase endotelial; bem como o SNP rs11549465 (1722 C>T do gene *HIF1A*), relacionado às atividades celulares hipóxia-dependentes. Os resultados estão apresentados, de modo comparativo, na Tabela 3.

Apenas as frequências genotípicas e alélicas do SNP rs1799983 (894G>T) (gene *eNOS*) foram significativamente diferentes entre os dois grupos de estudo, estando o genótipo TT em maior frequência entre os indivíduos com AF ($p < 0,001$). (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Frequência genotípica das mutações: SNP rs7203560 (*NPRL3*), VNTR rs61722009 e SNP rs1799983 (*eNOS*) e o SNP rs11549465 (*HIF1A*).

Anemia falciforme				Malária por <i>P. vivax</i>		<i>p</i> *
Gene (mutação)	Genótipo	Total (N=224)	Freq. genotípica	Total (N=101)	Freq. genotípica	
<i>HIF1A</i> (1772C/T) rs11549465	CC	197	87,9%	83	82,2%	0,073
	CT	23	10,4%	18	17,8%	
	TT	04	1,8%	0	0	
Gene (mutação)	Genótipo	Total (N=286)	Freq. genotípica	Total (N=106)	Freq. genotípica	<i>p</i> *
<i>eNOS</i> (4a4b) rs61722009	AA	15	5,2%	01	0,9%	0,086
	AB	123	43,0%	41	38,7%	
	BB	148	51,7%	64	60,4%	
(N=279)				(N=104)		
<i>eNOS</i> (894G/T) (rs1799983)	GG	199	71,3%	91	87,5%	0,003
	GT	73	21,2%	13	12,5%	
	TT	7	2,5%	0	0,0%	
Gene (mutação)	Genótipo	Total (N=300)	Freq. genotípica	Total (N=104)	Freq. genotípica	<i>p</i> *
<i>NPRL3</i> (T/G) rs7203560	TT	271	90,7%	98	94,2%	0,347
	GT	17	5,7%	05	4,8%	
	GG	11	3,7%	01	0,90%	

Os resultados foram apresentados de forma comparativa entre os dois grupos de estudo. Para rs11549465: homocigoto selvagem (CC) heterocigoto (CT) e homocigoto mutante (TT). Para rs61722009: homocigoto selvagem (4a4a) heterocigoto (4a4b) e homocigoto mutante (4b4b). Para rs1799983: homocigoto selvagem (GG) heterocigoto (GT) e homocigoto mutante (TT). Para rs7203560: homocigoto selvagem (TT) heterocigoto (GT) e homocigoto mutante (GG).

*Teste estatístico: *Qui-Quadrado* com $p < 0,05$ significativo caracterizados por números em negrito.

Tabela 4: Frequência alélica das mutações: SNP rs7203560 (*NPRL3*), VNTR rs61722009 e SNP rs1799983 (*eNOS*) e o SNP rs11549465 (*HIF1A*).

Gene mutação	Anemia falciforme		Malária vivax		<i>p</i> *
	N	%	N	%	
<i>HIF1A</i> rs11549465	Total = 448		Total = 202		
C	417	0,93	184	0,91	0,373
T	31	0,07	18	0,18	
<i>eNOS</i> (rs61722009)	Total = 572		Total = 212		
4a	153	0,27	43	0,20	0,063
4b	419	0,73	169	0,80	
<i>eNOS</i> (rs1799983)	Total = 558		Total = 208		
G	471	0,84	195	0,94	<0,001
T	87	0,16	13	0,06	
<i>NPRL3</i> rs7203560	Total = 600		Total = 208		
G	39	0,05	7	0,03	0,093
T	561	0,86	201	0,97	

Os resultados foram apresentados de forma comparativa entre os dois grupos de estudo. Para rs11549465 – C: alelo selvagem e T: alelo mutante. Para rs61722009 – 4a: alelo selvagem e 4b: alelo mutante. Para rs1799983 – G: alelo selvagem e T: alelo mutante. Para rs7203560 – G: alelo selvagem e T: alelo mutante
*Teste estatístico: *Qui-Quadrado* com $p < 0,05$ significativo caracterizados por números em negrito.

4.5 Associação das mutações com o perfil hemolítico

Com a finalidade de avaliarmos fatores genéticos como possíveis influenciadores no perfil hemolítico, investigamos a associação das mutações descritas acima com os marcadores bioquímicos de hemólise em ambos os grupos. Os resultados estão mostrados em tabelas distintas, pois os marcadores adotados para cada grupo foram diferentes.

Anemia falciforme

Entre os indivíduos desse grupo de estudo, diferenças nos marcadores hemolíticos de acordo com o padrão genotípico foi observada para ambas variantes genéticas do gene *eNOS*. Para o SNP rs1799983 (894G>T) (Tabela 5), indivíduos homocigotos selvagens (GG) apresentaram 1,3 vezes mais Hb plasmática do que os indivíduos portadores de ao menos um alelo mutante (genótipos GT e TT), enquanto que para a mutação VNTR rs61722009 (4a4b) (Tabela 6), indivíduos homocigotos mutantes (4b4b) apresentaram níveis de Hb plasmática aproximadamente 1,2 vezes menores.

O SNP rs7203560 do gene *NPRL3* não mostrou associação com o perfil hemolítico nesse grupo de estudo (Tabela 7).

Tabela 5: Relação do SNP rs1799983 (894G/T - *eNOS*) com os marcadores de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.

<i>eNOS</i> (894G>T)	Anemia falciforme		<i>p</i>
	GT/TT N=53	GG N=67	
Ret. Rel (%)	9,60 (± 1,38)	10,41 (± 0,37)	0,125
Ret. Abs (K/μL)	253,82 (± 9,70)	264,41 (± 9,16)	0,301
LDH (U/L)	776,02 (± 65,27)	682,73 (± 34,40)	0,195
AST (U/L)	41,50 (± 2,50)	42,77 (± 1,45)	0,562
BI (mm/dL)	2,98 (± 0,24)	2,76 (± 0,18)	0,558
Hb. plasmática (g/dL)	0,007 (± 0,0004)	0,009 (± 0,0005)	0,043*

Teste estatístico: *GLM* assumindo gênero, Hb F e HC como covariáveis e $p < 0,05$ como significativo. Para 894G>T: homocigoto selvagem (GG), heterocigoto (GT) e homocigoto mutante (TT). Alelo mutante (T) associado com menor biodisponibilidade de ON. Modelo recessivo foi considerado durante as análises.

Tabela 6: Relação da variante VNTR rs61722009 (4a4b - *eNOS*) com os marcadores de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.

<i>eNOS</i> (4a4b)	Anemia falciforme		<i>p</i>
	4a4a/4a4b N=87	4b4b N=99	
Ret. Rel (%)	10,75 (± 0,46)	10,16 (± 0,42)	0,258
Ret. Abs (K/μL)	266,60 (± 11,38)	263,45 (± 9,43)	0,690
LDH (U/L)	757,73 (± 45,7)	678,22 (± 41,14)	0,122
AST (U/L)	43,75 (± 2,03)	42,08 (± 1,78)	0,274
BI (mm/dL)	2,85 (± 0,18)	2,77 (± 0,17)	0,738
Hb. plasmática (g/dL)	0,010 (± 0,0007)	0,008 (± 0,0003)	0,010*

Teste estatístico: *GLM* assumindo gênero, Hb F e HC como covariáveis e $p < 0,05$ como significativo. Para 4a4b: homocigoto selvagem (4a4a) heterocigoto (4a4b) e homocigoto mutante (4b4b). Alelo selvagem (4a) associado com menor expressão gênica. Modelo recessivo considerado durante as análises.

Tabela 7: Relação do SNP rs7203560 (*NPRL3*) com os marcadores de hemólise em indivíduos com anemia falciforme.

<i>NPRL3</i>	Anemia falciforme		<i>p</i>
	TG/TT N=194	GG N=11	
Ret. Rel (%)	10,74 (± 0,84)	10,27 (± 0,29)	0,721
Ret. Abs (K/μL)	298,80 (± 25,57)	258,57 (± 6,81)	0,116
LDH (U/L)	742,86 (± 104,40)	719,89 (± 33,04)	0,797
AST (U/L)	39,44 (± 4,40)	43,21 (± 1,38)	0,464
BI (mm/dL)	3,00 (± 0,72)	3,64 (± 0,82)	0,791
Hb. plasmática (g/dL)	0,007 (± 0,0007)	0,009 (± 0,0004)	0,253

Teste estatístico: *GLM* assumindo gênero, Hb F e HC como covariáveis e $p < 0,05$ como significativo. Para rs7203560: homocigoto selvagem (TT) heterocigoto (TG) e homocigoto mutante (GG). Alelo mutante (G) assumido como protetor ao perfil hemolítico. Modelo recessivo considerado durante as análises.

Malária por P. vivax

Nesse grupo de estudo observamos associações apenas com o SNP rs1799983 (894G>T) do gene *eNOS*. Indivíduos homozigotos selvagem (GG) apresentaram níveis de Hb plasmática aproximadamente 1,3 vezes maiores que indivíduos portadores de ao menos um alelo mutante (GT e TT) (Tabela 8).

A variante VNTR rs61722009 (4a4b - *eNOS*) (Tabela 9) não esteve relacionado com o perfil hemolítico nesse grupo de estudo, enquanto a análise para o SNP rs7203560 do gene *NPRL3* não foi possível, devido à menor frequência do alelo mutante (G) e a ausência de dados hemolíticos desses indivíduos.

Tabela 8: Relação do SNP rs1799983 (894G/T- *eNOS*) com os marcadores de hemólise em indivíduos com malária.

Malária por <i>P. vivax</i>			
<i>eNOS</i> (894G>T)	GT/TT	GG	<i>p</i>
	N=13	N=92	
AST (U/L)	38,58 (± 4,43)	42,77 (± 8,12)	0,882
BI (mm/dL)	0,61 (± 0,06)	0,51 (± 0,08)	0,246
Hb. plasmática (g/dL)	0,013 (± 0,0006)	0,017 (± 0,001)	0,022

Teste estatístico: *GLM* assumindo idade como covariável e $p < 0,05$ como significativo.

Para 894G>T: homozigoto selvagem (GG), heterozigoto (GT) e homozigoto mutante (TT). Alelo mutante (T) associado com menor biodisponibilidade de ON. Modelo recessivo considerado durante as análises.

Tabela 9: Relação da VNTR rs61722009 (4a4b - *eNOS*) com os marcadores de hemólise em indivíduos com malária.

Malária por <i>P. vivax</i>			
<i>eNOS</i> (4a4b)	4a4b/4a4b	4b4b	<i>p</i>
	N=42	N=71	
AST (U/L)	37,26 (± 4,25)	47,56 (± 5,40)	0,227
BI (mm/dL)	0,51 (± 0,05)	0,64 (± 0,08)	0,782
Hb. plasmática (g/dL)	0,014 (± 0,001)	0,013 (± 0,0008)	0,638

Teste estatístico: *GLM* assumindo idade como covariável e $p < 0,05$ como significativo.

Para 4a4b: homozigoto selvagem (4a4a) heterozigoto (4a4b) e homozigoto mutante (4b4b). Alelo selvagem (4a) associado com menor expressão gênica. Modelo recessivo considerado durante as análises.

5.6. Associação do SNP 1722 C/T do gene *HIF1A* com a hipóxia

Quanto a influência de fatores genéticos em mecanismos relacionados com respostas fisiológicas de hemólise, também investigamos a associação dos SNP do gene *HIF1A* com os níveis plasmáticos da proteína HIF1A, um importante modulador da via da hipóxia.

Para ambos os grupos de estudo não houve associação significativa dos genótipos com os níveis proteicos de HIF1A (Tabela 10).

Tabela 10: Relação do SNP rs11549465 (1772C/T-*HIF1A*) com a proteína HIF1A em indivíduos com anemia falciforme e malária.

Proteína	Anemia falciforme			Malária por <i>P. vivax</i>		
	CC N=141	CT/TT N=19	<i>p</i>	CC N=81	CT/TT N=17	<i>p</i>
HIF1A (pg/ml)	640,97 (±25,82)	754,88 (±31,28)	0,603	656,95(±145,78)	479,64(±66,93)	0,084

Teste estatístico: *GLM* assumindo gênero, Hb F e HC como covariáveis para o grupo de estudo de AF, e idade indivíduos com malária. O valor de $p < 0,05$ como significativo.

Para rs11549465: homocigoto normal (CC) heterocigoto (CT) e homocigoto mutante (TT). Presença do polimorfismo associado com aumento da atividade transcricional do gene. Modelo recessivo considerado durante as análises.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como objetivo avaliar a associação de marcadores genéticos e bioquímicos relacionados com as vias da hemólise e de hipóxia, em indivíduos com diferentes perfis etiológicos de hemólise. Para isso, nossa casuística foi composta por indivíduos com AF, uma afecção hereditária monogênica caracterizada por hemólise crônica; e a malária causada pelo parasito *P.vivax*, que tem entre seus eventos fisiopatológicos, episódios de hemólise aguda, consequente da infecção parasitária.

Com os resultados obtidos, foi possível confirmarmos a hipótese de que os marcadores bioquímicos e genéticos aqui avaliados, apresentam diferentes relações com o perfil hemolítico e hipóxico entre os indivíduos com AF e malária por *P. vivax*. Os níveis de Hb plasmática, bem como da proteína HIF1A, estiveram presentes em maior proporção nos indivíduos com malária, grupo no qual a Hb plasmática também esteve diretamente relacionada com os marcadores bioquímicos de hemólise comumente adotados na rotina laboratorial. Observamos resultados divergentes no grupo de estudo de indivíduos com AF, no qual verificamos a relação dos marcadores de hemólise entre si, mas a ausência de relação desses com os níveis de Hb plasmática.

6.1 Perfil hemolítico e marcadores de hemólise

A hemólise, embora similar entre as doenças que apresentam tal processo em meio aos seus eventos fisiológicos, acomete de modo variável o desenvolvimento das manifestações clínicas de acordo com a etiologia hemolítica. No nosso estudo, ambos os grupos revelaram a presença significativa de hemólise. Entre os indivíduos com AF, os parâmetros hematológicos (GV, Hb total, VCM e HCM) e hemolíticos (Ret. Abs, Ret. Rel, LDH, AST e BI) estiveram acima dos valores de normalidade. Esses resultados eram esperados uma vez que, os indivíduos avaliados nesse estudo se encontravam em estado estacionário, condição essa em que os parâmetros hematológicos e hemolíticos correspondem às características fisiológicas próprias da doença (BALLAS, 2012), ou seja, a presença de anemia hemolítica consequente da hemólise crônica. Assim, considerando que a intensidade da anemia hemolítica é um fator de risco no estabelecimento das complicações clínicas na AF (NOURAIE et al., 2013), nossos

resultados reforçam a importância da caracterização do perfil hemolítico a partir da avaliação dos marcadores bioquímicos aqui considerados, os quais são amplamente relatados na literatura como bons biomarcadores de hemólise.

Os valores elevados de AST e BI nos indivíduos com malária, refletiram a presença de hemólise nesse grupo de estudo. Entretanto, os parâmetros hematológicos dentro da faixa de normalidade, revelam a ausência de anemia. Embora a hemólise nesses indivíduos seja um evento fisiopatológico importante, os critérios de exclusão para formação do nosso grupo de estudo isolaram potenciais fatores que poderiam contribuir para o estabelecimento da anemia hemolítica, como: gravidez, idade inferior à cinco anos, e presença de comorbidades como infecção por helmintos intestinais (BOEL et al., 2010; DOUGLAS et al., 2012). Além disso, devemos considerar que algumas anemias hemolíticas apresentam características normocíticas, ou seja, valores do parâmetro VCM dentro da faixa de normalidade e não indicando macrocitose, condição frequente entre os parâmetros hematológicos de indivíduos com anemias hemolíticas (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

Embora o estabelecimento da anemia hemolítica não tenha sido observado entre os indivíduos com malária da nossa casuística, outras consequências fisiológicas desencadeadas pelo processo de hemólise parecem influenciar de modo significativo nas manifestações clínicas. Por exemplo, apesar de a malária por *P. vivax* ser caracterizada por menores taxas de parasitemia quando comparada à infecção por *P. falciparum*, as respostas inflamatórias, assim como os danos endoteliais, são proporcionalmente maiores durante e após a infecção por *P. vivax*, quando consideradas similar biomassa parasitária (YEO et al., 2010; BAIRD et al., 2016). Ainda os estudos de Douglas e cols (2013) e Poespoprodjo e cols (2009) mostraram que a ocorrência de anemia grave em crianças foi maior em infecções por *P. vivax*, resultados que suportam a hipótese de que a anemia hemolítica estabelecida em indivíduos com malária por *P. vivax*, pode ser um fator contribuinte, mesmo que de forma indireta, para taxas de mortalidade e morbidade em regiões endêmicas (KENANGALEM et al., 2016).

Apesar de a AF e a malária apresentarem etiologias hemolíticas distintas, o estabelecimento da anemia se dá pelo mesmo mecanismo, ou seja, a ruptura prematura dos eritrócitos (BROADWAY-DUREN; KLASSEN, 2013). A presença da anemia entre os indivíduos com AF, condição esta ausente entre os indivíduos com malária, reforça a influência distinta da hemólise no estabelecimento das manifestações fenotípicas dessas

doenças. Essas diferenças também aparecem nas distintas correlações entre os marcadores de hemólise e de hipóxia, nos dois grupos de estudo.

Os parâmetros laboratoriais adotados para a avaliação do perfil hemolítico, são considerados marcadores de hemólise por refletirem respostas fisiológicas desencadeadas por vias relacionadas, mesmo que indiretamente, com a ruptura e remoção dos eritrócitos (STOJANOVIC; LIONNET, 2016). Sendo assim, devemos considerar que tais marcadores refletem efeitos sistêmicos e que, portanto, apresentam diferentes associações perante as singularidades fisiopatológicas de cada doença.

Para os indivíduos com AF, correlações significativas foram observadas entre os marcadores bioquímicos de hemólise (Ret. Abs, Ret. Rel, LDH, AST e BI) sugeridos como importantes para avaliação do perfil hemolítico nesses indivíduos (MINNITI et al., 2009; NOURAIE et al., 2013; KATO et al., 2014) e comumente utilizados na rotina laboratorial. Correlações foram observadas entre a enzima LDH com todos os demais marcadores, em especial entre LDH e AST, ambas enzimas utilizadas como marcadores de danos teciduais. A LDH e suas diferentes isoformas são também encontradas, em quantidades significativas, em diferentes tecidos, como o cardíaco e o pulmonar. Entretanto, a maior proporção desta enzima, quando no plasma sanguíneo de indivíduos com AF, é consequência de dano eritrocitário (STOJANOVIC; LIONNET, 2016), fazendo dessa um importante marcador de hemólise.

A LDH foi o único marcador de hemólise que esteve relacionado, embora inversamente, com os níveis de HIF1A. Sabemos que a resposta medular pode ser suficiente perante a processos hemolíticos, garantindo o equilíbrio entre a taxa de destruição e a produção compensatória dos eritrócitos. No entanto, em algumas condições etiológicas, altas taxas hemolíticas não compensadas, desencadeiam anemia hemolítica, que por sua vez, refletem em eventos fisiopatológicos e clínicos. Entre esses, a hipoxemia está intimamente relacionada com intensidade da anemia hemolítica (HEBBEL, 2011; NOURAIE et al., 2013). Sendo a proteína HIF1A um importante modulador de respostas celulares hipóxia-dependentes (TANIMOTO et al., 2003), é esperado que seus níveis estejam diminuídos em relação a maiores taxas hemolíticas, uma vez que a proteína, após sintetizada em resposta a menores concentrações de oxigênio, passa a ser intensamente utilizada. Essa hipótese justifica então a relação inversa entre LDH e os níveis HIF1A encontrada no nosso estudo, além de evidenciar a importância dessa enzima como marcador hemolítico, não só por refletir a ruptura eritrocitária, mas também por caracterizar resposta sistêmica consequentes do processo hemolítico.

Apesar das relações significativas entre os marcadores de hemólise nos indivíduos com AF, nenhum deles esteve relacionado com os níveis de Hb plasmática nesse grupo de estudo, nem mesmo com a LDH, que tem sido sugerida como um promissor marcador de hemólise intravascular (KATO et al., 2006; STOJANOVIC; LIONNET, 2016). Se considerarmos a taxa de aproximadamente 2/3 de hemólise extravascular na AF (BENSINGER; GILLETE, 1974), justificaria a menor relação entre a Hb plasmática e os marcadores de hemólise. No estudo de Nouraie e cols (2013), objetivando avaliar o perfil hemolítico de indivíduos com DF, considerando a variação dos parâmetros de hemólise, os pesquisadores elaboraram um *score* hemolítico a partir da associação dos marcadores de hemólise, que também foram avaliados no nosso estudo (Ret. Rel, LDH, AST e BI). A esse *score* numérico, deu-se o nome de índice hemolítico, o qual esteve positivamente relacionado com níveis elevados de Hb plasmática e micropartículas eritrocitárias, indicando-o como bom marcador de hemólise intravascular. No referido estudo, as enzimas LDH e AST foram os marcadores de hemólise que apresentaram maior relação com os índices hemolíticos, enzimas essas que estiveram mais correlacionadas no nosso grupo. Assim, embora não observamos correlações dessas enzimas com os níveis de Hb plasmática, a relação entre elas e, a participação na caracterização do perfil hemolítico de indivíduos com AF, é evidente, sugerindo novas investigações em casuísticas distintas, quanto a associação direta dessas com a hemólise intravascular.

Entre os indivíduos com malária, não observamos correlação significativa entre os marcadores de hemólise (AST e BI), mas sim desses com os níveis de Hb plasmática. Tal correlação sugere maior reflexo da hemólise intravascular nesses marcadores, comumente adotados na rotina laboratorial. Embora para o estudo de Douglas e cols (2012) a hemólise intravascular ocorre em menores taxas na malária por *P. vivax*, a fase intra-eritrocítica do ciclo de vida do parasito, é caracterizada por infecção ativa, ou seja, eventos agudos de ruptura eritrocitária resultando no surgimento dos primeiros sintomas clínicos da doença (MILLER et al., 2002). Uma vez que a coleta das nossas amostras aconteceu no momento em que os indivíduos apresentavam sintomas clínicos, e procuravam o serviço de saúde, supõem-se a ocorrência de hemólise no momento da coleta. Entretanto, devemos considerar que a remoção dos eritrócitos durante a infecção parasitária, ocorre especialmente por meio do sequestro esplênico, uma vez que a atividade metabólica do parasito altera a estrutura da membrana eritrocitária (BERTOWTIZ, 1991; WHITE, 2017). Portanto, fica evidente a relação entre os mecanismos de hemólise intra e extravascular, o que também justifica a relação entre os

níveis de Hb plasmática e a BI, considerando que 85% da bilirrubina circulante deriva do catabolismo da hemoglobina nos órgãos reticuloendoteliais. Quanto a AST, novas investigações merecem ser realizadas. Apesar de seu papel como marcador hemolítico, essa enzima é também um importante marcador de danos celulares, em especial danos hepáticos (BARCELLINI; FATIZZO, 2015), ocorrência presente na fase pré-eritrocítica do ciclo da doença, na qual os esporozoítos invadem os hepatócitos. Assim, os valores de AST podem estar sobrestimados, e não refletir apenas o processo de hemólise.

6.2. Hemólise intravascular e hipóxia

As quantificações de Hb plasmática, assim como da proteína HIF1A, foram diferentes entre os grupos de estudo, sendo os maiores valores observados no grupo de indivíduos com malária por *P. vivax*.

As menores concentrações de Hb plasmática entre os indivíduos com AF, podem ser reflexo das características fisiológicas próprias da doença. Os indivíduos que compuseram nosso grupo de estudo, apresentaram menores valores de Hb plasmática por estarem em estado estacionário da doença, condição em que menores taxas hemolíticas são observadas (KATO; STEINBERG; GLDWIN, 2017). No estudo de Kupesiz (2012), por exemplo, os indivíduos com DF, apresentaram de 0,001 a 0,033 g /dl de Hb plasmática. Para o nosso grupo de estudo, indivíduos com AF, sendo a condição mais grave da doença, eram esperadas maiores quantidades de Hb plasmática. No entanto, os valores observados (níveis médios de 0,009g/dL), encontram-se no intervalo descrito pelos autores acima citados. Além disso, apesar de ser um evento fisiopatológico importante, as taxas de hemólise intravascular podem variar de 10% a mais de 30% entre os indivíduos, variação essa também dependente da hemólise extravascular (BENSINGER; GILLETE, 1974; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017), que comumente ocorre em maior proporção.

Entretanto, a caracterização da hemólise intravascular de modo isolado tem se tornado importante, pois esse mecanismo já esteve associado a complicações clínicas da doença, em especial devido a respostas fisiológicas secundárias, como aumento da inflamação, danos endoteliais, estresse oxidativo e hipoxemia (CONRAN, 2014; ALMEIDA et al., 2015). Além disso, as menores taxas de hemólise intravascular observadas em indivíduos em estado estacionário, também já foram associadas com

complicações clínicas como, episódios dolorosos decorrentes de crises vaso-oclusivas e osteonecrose (KATO; STEINBERG; GLDWIN, 2017).

Embora a hemólise nos indivíduos com malária do nosso estudo, não tenha contribuído de forma significativa para o estabelecimento da anemia hemolítica, os maiores valores de Hb plasmática observados nesse grupo, representam um forte indicativo de que a hemólise merece ser considerada na infecção por *P. vivax*. A preferência desse parasito por reticulócitos resulta na retirada dessas células da corrente sanguínea, antes mesmo de assumir a maturidade fisiológica celular. Somado a isso, a remoção de eritrócitos infectados e não infectados ocorre em taxas aproximadamente quatro vezes maiores na infecção por *P. vivax* quando comparada à infecção por *P. falciparum*, desencadeando repostas fisiológicas significativas que podem favorecer manifestações clínicas como disfunção hepática, icterícia e trombocitopenia (McKEYN; JEFFERY; COLLINS, 2002; COLLINS; JEFFERY; ROBERTS, 2003; KOCHAR et al., 2014), ou até mesmo, respostas fisiológicas secundárias como hipoxemia.

Os valores de HIF1A estiveram aumentados nos indivíduos com malária ($689,82 \pm 29,42$ pg/mL) em comparação ao grupo com AF ($393,49 \pm 22,60$ pg/mL), e ambos valores se mostraram elevados em relação a um grupo de 55 indivíduos sem anemias hereditárias ($289,60 \pm 12,30$ pg/mL) previamente avaliado pelo nosso grupo de pesquisa (Torres, 2016). Esses resultados sugerem o aumento na síntese de HIF1A nos grupos de estudo, indicando a hipoxemia entre os eventos fisiológico nas duas doenças. Apesar da ausência de anemia hemolítica, os valores aumentados de HIF1A revelam a necessidade de respostas celulares adaptativas à hipóxia, entre os indivíduos com malária. A infecção aguda do protozoário desencadeia a hemólise que, por sua vez, provoca a diminuição na concentração de oxigênio circulante, podendo culminar em lesões pulmonares, seguidas de disfunção respiratória e até mesmo falência circulatória (BAIRD, 2015; SIQUEIRA et al., 2015). Entretanto, essas manifestações clínicas ocorrem, em especial, nos casos de malária por *P. vivax* grave (LEE et al., 2013), diagnóstico esse que não foi observado entre os indivíduos do nosso grupo de estudo. Assim, embora a hipóxia pareça ser evento fisiológico importante, outras investigações quanto a sua associação com o estabelecimento de manifestações clínicas nos casos de malária por *P. vivax* merecem ser consideradas.

Entre os indivíduos com AF, se considerarmos a complexidade fisiopatológica da doença, é evidente que outros eventos fisiológicos podem influenciar, de maneira significativa, na relação entre hemólise e hipoxemia. Por exemplo, além da remoção dos

eritrócitos e diminuição do O₂ circulante, a polimerização da Hb S resulta em eritrócitos mais rígidos que retardam ou até mesmo interrompem o fluxo sanguíneo, causando isquemia tecidual (KATO; TAYLOR, 2010). O estabelecimento de isquemia favorece a inflamação e a produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, podem promover a degradação da proteína, reduzindo as taxas de HIF1A (DEMIDENKO et al., 2006, CONRAN; ALMEIDA, 2016). Assim, além das repostas celulares adaptativas nesse grupo de estudo, outros eventos fisiopatológicos característicos da doença podem culminar na diminuição dos níveis dessa proteína.

6.3. Variantes genéticas e marcadores bioquímicos de hemólise e hipóxia

Ambas as doenças aqui estudadas, apresentam entre seus eventos fisiopatológicos a hemólise, frequentemente associada ao estabelecimento das manifestações clínicas. Assim, considerando a participação de fatores genéticos na heterogeneidade fenotípica dos indivíduos com AF e malária por *P. vivax*, avaliamos variantes genéticas de genes responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas em vias relacionadas com o processo de hemólise.

Na busca por mutações que possam exercer papel de moduladores genéticos, avaliamos a frequência das variantes selecionadas nesse estudo, de modo comparativo entre os grupos de estudo. Além da busca pela relação entre fatores genéticos e manifestações clínicas, investigações de variantes genéticas em populações miscigenadas como a brasileira, são indicadas, uma vez que, a heterogeneidade fenotípica entre os indivíduos é consequência, em parte, dos distintos padrões de herança dessas variantes nas populações (WINKLER; NELSON; SMITH, 2010).

Nossos resultados mostraram que, em meio as variantes rastreadas, apenas o SNP rs1799983 (894G/T) do gene *eNOS* apresentou diferenças nas frequências genotípicas e alélicas entre os grupos de estudo. A frequência do alelo mutante (T), assim como dos genótipos heterozigoto (GT) e homozigoto mutante (TT), foi maior nos indivíduos com AF, quando comparada a frequência observadas nos indivíduos com malária. Esse SNP também esteve associado ao perfil hemolítico dos indivíduos de ambos grupos de estudo, embora de modo controverso ao observado na literatura. No nosso grupo de estudo, valores elevados de Hb plasmática foram observados nos indivíduos com genótipo GG, e não naqueles com GT e TT, genótipos esses que já foram associados a menores taxas

hemolíticas caracterizadas por menores percentuais de reticulócitos e de LDH foram, em indivíduos com AF (AGUIAR et al., 2018).

A presença do alelo mutante (T) desse SNP já esteve relacionada com menores taxas de biodisponibilidade de ON (TESAURO et al., 2000), sugerindo-o como um possível modulador genético. Entretanto, os mecanismos envolvidos na depleção do ON durante a hemólise, são influenciados, de modo distinto, pelas respostas fisiológicas características das doenças (ALMEIDA et al., 2015; BARBER et al., 2016). Na malária, por exemplo, a associação entre os NO e as disfunções endoteliais com ocorrências de eventos fisiopatológicos, são controversos. Enquanto o estudo de Carvalho e cols (2010) observou o aumento da citoaderência endotelial em infecção por *P. vivax*, um processo que poderia ainda ser agravado pela menor biodisponibilidade do ON, uma vez que é considerado um gás com papel de vasodilatador endógeno, Barber e cols (2016) revelou que as disfunções endoteliais consequentes da diminuição da biodisponibilidade de NO, não estiveram associadas à maiores taxas de hemólise intravascular. Assim, a participação de variantes genéticas que possam exercer influência modulação dos níveis de ON, bem como a relação entre a biodisponibilidade desse gás e sua relação com o processo hemolítico em malária por *P. vivax*, ainda merecem ser investigadas.

A outra variante do gene *eNOS*, a VNTR rs61722009 (4a4b), também esteve relacionada com o perfil hemolítico, entretanto, apenas entre os indivíduos com AF. Maiores níveis de Hb plasmática foram observados entre os indivíduos que apresentaram os genótipos 4a4a e 4a4b, genótipos esses já associados com menores taxas de expressão do gene *eNOS* (TSUKADA et al., 1998). Maior frequência desses genótipos também foram observadas em indivíduos com DF que apresentavam alterações cardíacas, nefropatias e acidente vascular cerebral (TANTAWY et al., 2015), sugerindo que a presença da variante, desempenhe papel prejudicial somatório á danos da homeostase endotelial, influenciando a ocorrência de eventos fisiopatológicos, como a hemólise intravascular. Assim, essa variante é sugerida como possível modulador genético na síntese de ON. Entretanto, futuras investigações quanto ao seu papel de modulador genético são necessárias, em especial, estudos que envolvam associações dessa mutação com diferentes manifestações clínicas.

A associação das duas variantes do gene *eNOS* com o perfil hemolítico dos indivíduos com AF, mas não entre os indivíduos com malária, pode ainda ser sugerida devido a relação haplotípica que elas apresentam (NISHANK, 2013; AGUIAR et al., 2016). Durante o processo de miscigenação populacional, o fluxo de genes que

participaram da formação e da variabilidade genética dos indivíduos, ocorrem num primeiro momento, na forma de grandes blocos de hapótipos. Assim, variantes polimórficas constituintes desses “blocos” tendem a segregarem juntas ao longo das gerações, carregando consigo parte das características da população ancestral (WINKLER; NELSON; SMITH, 2010).

As frequências genóticas e alélicas da outra variante avaliada quanto sua associação com o perfil hemolítico, o SNP rs7203560 do gene *NPRL3*, não foram diferentes entre os grupos. Pesquisa prévia no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) revelou baixíssima frequência alélica deste polimorfismo na população Europeia (HapMap CEU = 0), mas um pouco maiores em indivíduos de origem Africana (HapMap Yoruban = 14%). Considerando que entre os grupos de estudo avaliamos indivíduos com AF, uma doença genética causada por uma mutação de origem Africana, esperávamos encontrar diferenças significativas.

Além da ausência de diferentes frequências alélicas e genóticas, esse SNP, sugerido como marcador genético de hemólise (MILTON et al., 2013), também não esteve associado com o perfil hemolítico dos indivíduos da nossa casuística. Milton e cols (2013) avaliaram a associação do SNP rs7203560 com índices hemolíticos em indivíduos com AF, ajustando as variáveis Hb F e presença de talassemias alfa, e encontraram menores níveis de hemólise, quando na presença do alelo mutante (G). Devido ao forte desequilíbrio de ligação desse SNP com variantes localizadas próxima à região reguladora do *cluster HBA1/HBA2*, os pesquisadores sugeriram ainda, que a presença do alelo protetor (G) pudesse exercer similaridade fenotípica com as observadas em indivíduos com talassemias do tipo alfa, importante modulador genético da AF. Nesse caso, o traço alfa talassêmico herdado protege o indivíduo, pois reduz a concentração de Hb em cada eritrócito, diminuindo a tendência de polimerização da Hb S, o que resulta na diminuição de hemólise (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010), garantindo, na maioria dos casos, benefícios clínicos ao indivíduo.

Embora a associação o SNP rs7203560 (*NPRL3*) com o perfil hemolítico não tenha sido significativa na nossa casuística, um breve estudo do nosso grupo de pesquisa, ao realizar análise *in silico* na busca por sítios de ligação de fatores de transcrição (FT) associados ao SNP, revelou resultados promissores. Entre os 80 sítios encontrados quando na presença do alelo selvagem (T), seis são de FTs que já estiveram relacionados a hematopoiese e expressão dos do *cluster HBA1/HBA2* (Anexo B). Considerando a importância dos FTs como possível unidade moduladora de expressão gênica, na presença

do alelo polimórfico (G), os sítios desses FTs poderiam ser alterados e, os níveis de expressão do *cluster* alfa globínico alterados. Essas análises serão realizadas numa próxima etapa. Assim, nossos resultados, nos permitem sugerir que influência SNP rs7203560 no perfil hemolítico, pode ser dar por meio de mecanismos genéticos, indiretamente relacionados, com a expressão do *cluster* alfa globínico. Milton e cols (2013) ainda sugerem que o papel de marcador genético dessa variante merece ser avaliada em outras doenças com etiologia hemolítica distinta, sugerindo a malária como forte candidata. Infelizmente, a baixa frequência do alelo polimórfico no nosso grupo de estudo de indivíduos com malária por *P. vivax*, não nos permitiu realizar a análise de associação dessa variante com o perfil hemolítico.

Por fim, o SNP rs11549465 do gene *HIF1A*, apresentou frequência genotípicas semelhantes as observadas pelo nosso grupo de pesquisa, em estudo prévio, realizado em indivíduos com DF (Torres, 2016). A frequência do genótipo TT (1,8%), o qual está associado com o aumento da atividade transcricional gênica (BAHADORI et al., 2010), foi semelhante ao observado em outros estudos, com diferentes populações de indivíduos sem hemoglobinopatias, como caucasianos poloneses (TT-1,6%) (MORRIS et al., 2009) e em populações miscigenadas (caucasianos e afro-americanos – (TT-1,5%) (CHAU et al., 2005). Segundo nosso conhecimento, não havia relatos na literatura da avaliação dessa variante em casuísticas com malária por *P. vivax*, sendo inéditos os nossos resultados.

Apesar da suposta influência na transcrição gênica, não houve um aumento significativo nos valores de HIF1A quando na presença dos genótipos CT e TT, apesar de observarmos maiores concentrações proteicas entre os indivíduos com AF desse grupo genotípico. Já entre os indivíduos com malária, os resultados foram controversos pois entre os indivíduos com esses genótipos, menores concentrações proteicas foram observadas, embora também não significativos.

A diminuição das concentrações de oxigênio e a isquemia tecidual são os principais estímulos para ativação do *HIF*. Entretanto, uma série de mecanismos podem potencialmente induzir a expressão de *HIF1A*, entre esses algumas citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF α) e a interleucina-1 (IL-1 β) (KAUL et al., 2013). Estudos em diferentes tipos de câncer, também uma doença inflamatória, mostraram resultados controversos sobre o papel protetor desse SNP (ANAM et al., 2015). Além disso, a proteína HIF1A é um fator de transcrição que atua regulando a expressão de genes que controlam funções celulares como apoptose, proliferação celular, eritropoiese, metabolismo do ferro e angiogênese (Ke Q; COSTA, 2006; YOUSAF ;

SPINOWITZ, 2016), mecanismos esses que sofrem influência direta do processo hemolítico presente nas doenças aqui estudadas. Assim, é evidente que outros mecanismos possam interferir na expressão gênica e conseqüentemente nos níveis proteicos desse marcador de hipóxia.

Frente aos nossos resultados, notamos que a hemólise está refletida de modo distinto nos perfis hemolíticos. A heterogeneidade fenotípica dos indivíduos com AF, não totalmente explicada pela mutação que origina a Hb S, resulta na busca incessante por moduladores genéticos e ambientais que possam caracterizar a heterogeneidade fenotípica entre os indivíduos (HABARA; STEINBERG, 2016; KATO; STEINBER; GLADWIN, 2017). A mesma necessidade de conhecimento se observa nos casos graves e fatais de malária por *P. vivax*. A biologia singular do *P. vivax* refletida nos casos de reinfestação pelas formas latentes (HOWES et al., 2016), assim como quanto à resistência aos tratamentos e a ampla distribuição geográfica, não nos permite restringir o conhecimento dos casos graves dessa parasitose, ao que se conhece da fisiopatologia e manifestações clínicas dos casos de infecção por *P. falciparum*. Assim, as singularidades das relações dos marcadores em cada doença, sugere que o processo de hemólise seja um importante evento fisiopatológico a ser investigado na busca por maiores compreensões dessas doenças.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos para responder aos objetivos deste estudo, podemos concluir:

1. Os parâmetros hemolíticos estão elevados entre os indivíduos com anemia falciforme e com malária por *P. vivax*, indicando a ocorrência de hemólise em ambos os grupos de estudo.

2. A proteína HIF1A e a hemoglobina plasmática estão quantitativamente mais elevados nos indivíduos com malária, indicando que a hemólise intravascular ocorre em maior proporção nesse grupo. As menores quantidades de HIF1A nos indivíduos com anemia falciforme sugerem a maior proporção de hipóxia nesse grupo de estudo, e consequente, maior consumo dessa proteína.

3.a) Marcadores bioquímicos de hemólise estão correlacionados entre si na anemia falciforme, embora não tenham sido relacionados com a hemoglobina plasmática, sugerindo que a maior parte da hemólise não é intravascular. Na malária, esses marcadores estão relacionados com a hemoglobina plasmática, indicando maior participação da hemólise intravascular durante o estabelecimento do perfil hemolítico dos indivíduos do nosso grupo de estudo.

b). Os níveis de LDH são inversamente relacionados com os níveis de HIF1A na anemia falciforme, sugerindo o consumo de HIF1A em resposta à hipoxemia causada pela intensa anemia hemolítica.

4. As frequências genotípicas e alélicas do SNP 894G>T do gene *eNOS* diferem entre os grupos, sendo o alelo T mais frequente em indivíduos com anemia falciforme. As frequências genotípicas e alélicas das variantes genéticas VNTR 4a4b (*eNOS*), e os SNPs rs720356 0 (*NPRL3*) e 1772C>T (*HIF1A*) não diferem entre os grupos.

5. Os genótipos GG e GT da variante 894G>T do gene *eNOS* estão associados a maiores níveis de Hb plasmática na anemia falciforme e na malária, indicando a sua influência no perfil hemolíticos desses indivíduos. Os genótipos 4a4a e 4a4b do VNTR 4a4b do gene *eNOS* apresentam a mesma associação para a anemia falciforme. Os SNP

rs7203560 (gene *NPRL3*) e rs11549465 (1722 C>T do gene *HIF1A*) não estão associados à hemólise ou à hipóxia, respectivamente, em ambos grupos de estudo.

Assim, as diferentes relações dos marcadores bioquímicos e genéticos com o perfil hemolítico, observada entre os indivíduos com AF e malária por *P. vivax*, comprovam a importância da caracterização do processo de hemólise em doenças com diferentes etiologias hemolíticas. Por fim, os marcadores bioquímicos laboratoriais de hemólise, comumente adotados na rotina laboratorial para a caracterização do perfil hemolítico desses indivíduos, demonstraram ser importante biomarcadores para essas doenças.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. et al. Sick Cell anemia- Nitric oxide related genetic modifiers of hematological and biochemical parameters. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 64, n. 4, p. 957-963, 2016.
- AKINSHEYE, I.; KLINGS. E.S. Sick Cell Anemia and Vascular Dysfunction: The Nitric Oxide Connection. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, p. 620-625, 2010.
- AKIONSOGLU, K.S.; SOLOMOU, E.E.; GOGOS. C.A. Malaria: a haematological disease. **Hematology (Amsterdam. Netherlands)**, v. 17, n. 2, p. 106-114, 2012.
- ALEXANDRE, M.A. et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, n. 10, p. 1611-4, 2010.
- ALLEN, S.J. et al. alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 94, n. 26, p. 14736–14741, 1997.
- ALMEIDA, C.B. et al. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. **Blood**, v. 126, n. 6, p. 711-20, 2015.
- ANDRADE, B.B. et al. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v.13, p. 9-13, 2010.
- ANAM, M.T. et al. A meta-analysis of hypoxia inducible factor 1-alpha (HIF1A) gene polymorphisms: association with cancers. **Biomarker Research**, v. 3, p. 29, 2015.
- AREVALO-HERRERA, M. et al. Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. *Acta Tropica*, v. 3, n. 121, p. 303–314, 2012.
- BAHADORI, B. et al. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. **Vascular Medicine (London. England)**, v. 15, p. 371-374, 2010.
- BAIRD, J.K. Evidence and implications of mortality associated with acute Plasmodium vivax malaria. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 36-57. 2013.
- BAIRD, J.K. Origins and implications of neglect of G6PD deficiency and primaquine toxicity in Plasmodium vivax. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 3, p. 93-196, 2015.
- BALLAS, S.K. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n. 1, p. 243-244, 2013.
- BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. **American journal of hematology**, v. 87, n. 3, p. 338, 2012.

- BARBER, B.E. et al. Nitric Oxide-Dependent Endothelial Dysfunction and Reduced Arginine Bioavailability in *Plasmodium vivax* Malaria but no Greater Increase in Intravascular Hemolysis in Severe Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1557 – 1564, 2016.
- BARCELLINI, W.; FATTIZZO. B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. **Disease markers**. 635670, 2015.
- BARRETT, J.C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 12, p. 263–265, 2005.
- BELCHER, J. D. et al. Heme egradation and vascular injury. **Antioxid & Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 233-48, 2010.
- BENSINGER, T.A.; GILLETE, P.N. Hemolysis in sickle cell disease. **Arch Intern Med**, v. 133, n. 4, p. 624-31, 1974.
- BERKOWITZ, F.E. Hemolysis and infection: categories and mechanisms of their interrelationship. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1151-62, 1991.
- BIERHANSL, L. et al. Central role of metabolism in endothelial cell function and vascular disease. **Physiology**, v. 32, n. 2, p. 126–140, 2017.
- BOEL, M. et al. Complex Interactions between soil-transmitted helminths and malaria in pregnant women on the Thai-Burmese border. **PLoS neglected tropical disease**, v. 11, n. 4, p. e887, 2010.
- BONINI-DOMINGOS. C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de HemoglobiONpatias e Talassemias..** São José do Rio Preto-SP: HN Editora. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) – **Malária. Resumo epidemiológico de malária no Brasil**. 2017. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria>. Acesso em 23 jan. 2018.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet. Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038-e1046, 2017.
- BROADWAY-DUREN, J.B.; KLAASSEN. H. Anemias. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 411-426, 2013.
- CABOOT, J.B; ALLEN, J.L. Hypoxemia in Sickle Cell Disease: Significance And Management. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 15, n. 1, p. 17-23, 2014.
- CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

- CONRAN, N. Intravascular Hemolysis: A disease Mechanism Not Be Ignored. **Acta Haematologica**, v. 132, p. 97-99, 2014.
- CONRAN, N.; ALMEIDA, C.B. Hemolytic vascular inflammation: na update. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 1, p. 55-57, 2016.
- CARDON, L.R; BELL, J.I. Association study designs for complex diseases. **Nature Genetics**, v. 2, p. 91-99, 2001.
- CARVALHO, B.O. et al. On the cytoadhesion of Plasmodium vivax-infected erythrocytes. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 4, p. 638-47, 2010.
- CHAU, C.H. et al. Polymorphism in the hypoxia-inducible factor 1alpha gene may confer susceptibility to androgen-independent prostate cancer. **Cancer biology & therapy**, v. 4, n. 11, p. 1222-1225, 2005.
- COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M.; ROBERTS, J.M. A retrospective examination of anemia during infection of humans with Plasmodium vivax. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.4, n. 68, p. 410-412, 2003.
- CORTESE-KROTT, A. et al. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS in health and disease. **Blood**, v. 120, n. 20, p. 4229-37, 2012.
- DEMIDENKO, Z.N. et al. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α is limited by transcription-dependent depletion. **Oncogene**, v. 30, n. 24, p. 4829-38, 2005.
- DHALIWAL, G.; CORNETT, P.A.; TIERNEY, L.M. Hemolytic anemia. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2599-606,2004.
- DOUGLAS, N.M. et al. The anaemia of Plasmodium vivax malaria. **Malaria journal**, v. 11, n. 135, p. 135, 2012.
- DOUGLAS, N.M. et al. Major burden of severe anemia from non-falciparum malaria species in Southern Papua: a hospital-based surveillance study. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 10, p. e100157, 2013.
- EELLEN, G. et al. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. **Circulation Research**, v. 116, n. 7, p. 1231–1244, 2015.
- ENGWERDA, C.R.; GOOD, M.F. Interactions between malaria parasites and the host immune. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 4, p. 381-7, 2005.
- FENDEL, R. et al. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia. **PLoS One**, v. 5, n. 4, e10038, 2010.
- GLADWIN, M.T.; KANIAS, T.; KIM-SHAPIRO, D.B. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, p. 1205-1208, 2012.

- GLADWIN, M.T.; KATO, G.J. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: Role of nitric oxide and hemolytic anemia. **Hematology/ The Education Program of the American Society of Hematology**. p. 51–57. 2005.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica – 11^{ed} – Elsevier, 2006.
- HABARA, A.; STEIMBERG, M.H. Genetics basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 7, n. 241, p. 689-96, 2016.
- HALDAR, K. Transport mechanisms in Plasmodium-infected erythrocytes: lipid rafts and a tubovesicular network. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1393-1401. 2007.
- HEBBEL, R.P. Reconstructing sickle cell disease: A data-based analysis of the "hyperhemolysis paradigm" for pulmonary hypertension from the perspective of evidencebased medicine. **American Journal of Hematology**, v. 86, n. 2, p. 123-154, 2011.
- HEDRICK, P.W. Population genetics of malaria resistance in humans. **Heredity (Edinb)**, v. 107, n. 4, p. 283-304, 2011.
- HOWES, R.E. et al. Global Epidemiology of Plasmodium vivax. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 25, n. 6, p. 15–34, 2016
- HUGHES, J. R. et al. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification and functional assessment of multispecies conserved sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 28, p. 9830–5, 2005.
- IAROVAIA, O. V. et al. Evolution of α - and β -globin genes and their regulatory systems in light of the hypothesis of domain organization of the genome. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 79, n. 11, p. 1141–50, 2014.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>> Acesso em 15 de Dezembro de 2017.
- JI, P.; MURATA-HORI, M.; LODISH, H.F. Formation of mammalian erythrocytes: Chromatin condensation and enucleation. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n.7, p. 409–415, 2011
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. – 11.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 238-231, 2008.
- KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37-47, 2007.
- KATO, G.J.; TAYLOR, J.G. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. **British journal of haematology**, v. 148, n. 5, p. 690-701, 2010.

KATO, G.J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance. priapism. leg ulceration. pulmonary hypertension. and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, 2014.

KATO, G.J. Defective Nitric Oxide Metabolism in Sickle Cell Disease. **Pediatric blood & cancer**, v. 62. n. 3, p. 373-374, 2015.

KATO, G.J.; STEINBERG, A.H.; GLADWIN, M.T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750-760, 2017.

KRISTIANSEN, M. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198-201, 2001.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 1469-80, 2006.

KENANGALEM, E. et al. Plasmodium vivax infection: a major determinant of severe anaemia in infancy. **Malaria Journal**, v. 15, p. 321, 2016.

KIM, A.; NEMETH, E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. **Current Opinion in Hematology**, v. 22, n. 3, p. 199-205, 2015.

KOCHAR, D.K. et a. Severe Plasmodium vivax malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 194-8, 2009.

KUPESIZ, A. et al. The effect of hemolysis on plasma oxidation and nitration in patients with sickle cell disease. **Free Radical Research**, v. 46, n. 7, p. 883-890, 2012.

LACERDA, M.V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malar Journal**, v. 11, p. 12, 2012.

LEE, H.J. et al. A Case of Vivax Malaria Complicated by Adult Respiratory Distress Syndrome and Successful Management with Extracorporeal Membrane Oxygenation **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 5, p. 551-5, 2013.

LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Principios de bioquímica. [s.l.] Omega, 2006.

LETTRE, G. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 2, 2012.

LOBO, C.L. et al. Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 1, p. 34-9, 2014.

LÓPEZ, C. et al. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. **Gene**, v. 467, n. 1-2, p. 1-12, 2010.

- MARENGO – ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.
- MCKENZIE, F.E.; JEFFERY, G.M.; COLLINS, W.E. Plasmodium vivax blood-stage dynamics. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 3, p. 521–535, 2002.
- MILLER, L.H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 6872, n. 415, p. 673-679, 2002.
- MILTON, J.N. et al. Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. **British journal of haematology**, v. 161, p. 270-278, 2013.
- MINNITI, C.P. et al. Elevated tricuspid regurgitant jet velocity in children and adolescents with sickle cell disease: association with hemolysis and hemoglobin oxygen desaturation. **Haematologica**, v. 94, n. 3, p. 340-7, 2009.
- MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 6, p. 480–487, 2008.
- MOREIRA, J.A. et al. Influence of β S-Globin Haplotypes and Hydroxyurea on Arginase I Levels in Sickle Cell Disease. **Disease Markers**, p.5. 2016.
- MORRIS, C. R.; GLADWIN. M. T.; KATO. G. J. Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 620 – 632, 2008.
- MORRIS, M.R.. Mutation analysis of hypoxia-inducible factors HIF1A and HIF2A in renal cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 29, n. 11, p. 4337-4343, 2009.
- MORRIS, C.R. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 96, n. 1, p. 24-33, 2011.
- MOYES, C. et al. Defining the Geographical Range of the Plasmodium knowlesi Reservoir. **PLoS neglected tropical disease**, v. 8, n. 3, p. e2780, 2014.
- NGO, D.A.; STEINBERG, M.H. Genomic approaches to identifying targets for treating β hemoglobinopathies. **BMC medical genomics**, v. 8, n. 44. 2015.
- NISHANK, S.S. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Gene Polymorphism is Associated with Age Onset of Menarche in Sickle Cell Disease Females of India. **Mediterranean Journal of Hematological and Infectious Diseases**, n. 5, v. 1, 2013.
- NOURAIE, M. et al. The relationship between the severity of hemolysis. clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Haematologica**, v. 98, p. 464-462, 2012.
- OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria journal**, v. 30, n. 9, p.115, 2010.

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

PENA, S.D. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. 17063, 2011.

QUINTERO, J.P. et al. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 91-104, 2011.

RAMOS-JÚNIOR, W.M. et al. Clinical aspects of hemolysis in patients with *P. vivax* malaria treated with primaquine, in the Brazilian Amazon. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 410-2, 2010.

RAPIDO, F. The potential adverse effects of haemolysis. **Blood Transfusion**, v. 15, p. 218-221, 2017.

RAPOSO, C.C. et al. Plasmodium vivax malaria: related factors to severity in the State of Maranhão. Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46. p. 67-72. 2013.

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

REITER, C.D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1383-1389, 2002.

RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 500, 2014.

ROTHER, R.P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 13, p. 1653-1652, 2005.

SANKARAN, C.G.; WEISS, M.J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nature Medicine**, v. 21, n. 3, 2015.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

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

SCHAER, D.J.; BUEHLER, P.W. Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 6, 2013.

- SCHAER, D. J. et al. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**, v. 121, n. 8, 1276–1284, 2013.
- SEMENZ, G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. **Cell**, v. 148, n. 3, p. 399–408, 2012.
- SERJEANT, G. Sickle haemoglobin comes of age. **The Lancet. Global Health**, v. 2, n. 2, p. e59-60, 2014.
- SIMÕES, B.P. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. *Anais Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, 2010, pp. S46-S53.
- SIQUEIRA, A.M. et al. Characterization of Plasmodium vivax-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. **BMC Medicine**, v. 57, n. 13, p. 57, 2015.
- SONUONU, G. et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, p. 283-292, 1993.
- STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillieres Clinical Haematology**, v. 11, n. 1, p. 163-184, 1998.
- STEINBERG, M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 4, p. 465–481, 2005.
- STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Scientific World Journal**, v. 9. p. 46-67. 2009.
- STEINBERG, M.H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 8, p. 824–826, 2012.
- STEINBERG, M.H. et al. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: Hoffman R, Hematology: Basic Principles and Practice, 6th, ed. Philadelphia, PA. Elsevier Saunders; 2013; chap 31.
- STANKOVIC, S. K.; LIONNET, F. Lactate dehydrogenase in sickle cell disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 458, p. 99-102, 2016.
- SUN, K.; XIA, Y. New insights into sickle cell disease: a disease of hypoxia. **Current opinion in hematology**, v. 20, n. 3, p. 215-221, 2013.
- TANIMOTO, K. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity. implying clinical significance. **Carcinogenesis**. v. 24, n. 11, p. 1779-1783, 2003.
- TANTAWY, A.A.G. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Intron 4 VNTR Polymorphism in Sickle Cell Disease: Relation to Vasculopathy and Disease Severity. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 3, p. 389-394, 2015

- TAYLOR, J.G. et al. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e2095, 2008.
- TESAURO, M. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 6, p. 2832-5, 2000.
- TESTA, N.G.; DEXTER, T.M. Long-term hematopoietic damage: concepts, approaches, and results relevant to the study of environmental toxins. *Environmental Health Perspectives*, n. 82, p.51-56, 1989.
- TORRES, Lidiane de Souza. Polimorfismos genéticos e expressão de marcadores envolvidos em processos inflamatórios, angiogênicos, e de hipóxia na doença falciforme. 2016. 220f. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Genética, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto.
- TSUKADA, T. et al. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, n. 1, p. 190-3, 1998.
- TUTEJA, R. Malaria - an overview. **The FEEBS journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-9, 2007.
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 3. ed. [s.l.] ARTMED, 2006.
- WEATHERALL, D. et al. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 921-923, 2005.
- WINKLER, G.; NELSON, G.W.; SMITH, M.W. Admixture mapping comes of age. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 11, p. 65-89, 2010.
- WHITE, N.J. Malaria parasite clearance. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 194, 2017.
- WHO: World Malaria Report 2016, 2017.
- WHO: World Malaria Report 2017, 2018.
- YEO, T.W. et al. Greater endothelial activation, Weibel-Palade body release and host inflammatory response to Plasmodium vivax, compared with Plasmodium falciparum: a prospective study in Papua, Indonesia. **The Journal of Infectious Disease**, v. 202, n. 1, p. 109–112, 2010.

YOUSAF, F.; SPINOWITZ, B. Hypoxia-Inducible Factor Stabilizers: a New Avenue for Reducing BP While Helping Hemoglobin?. **Current Hypertension Reports**, v. 18, n. 3, p. 23, 2016.

ZEPEDA, A.B. et al. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 6, p. 451-9, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Testes clássicos para caracterização do perfil hemoglobínico

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

As lâminas para avaliação da morfologia eritrocitária foram confeccionadas à partir de esfregaço sanguíneo de sangue total. Após a análise em microscópio de luz, em objetiva 40x, o tamanho, a forma e a quantidade de hemoglobina nos eritrócitos foram as características analisadas. As amostras foram classificadas por resultados segundo padronização do LHGDH/UNESP:

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

- *Resistência dos eritrócitos à hemólise* (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Reagentes:

Solução estoque de NaCl a 10% pH 7,4:

NaCl	9,0g
Na ₂ HPO ₄	1,36g
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	0,28g
Água destilada q.s.p	100mL

Solução trabalho:

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

Procedimento: Em um tubo de ensaio foram colocados 2,0 mL de solução de NaCl a concentração de 0,36% e 10 µL de sangue total, seguido sucessivas inversões. A leitura foi feita após 10 min de incubação.

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

- *Hemolisado rápido*

Homogeneização de amostras de sangue total com saponina para hemolisado dos eritrócitos e obtenção da solução de hemoglobina.

Reativo hemolisante:

Saponina P.A.	1 g
Água destilada	100 mL

Procedimento: Em placa de *Kline* foi colocado 1 volume de sangue total com 2 volumes de reativo hemolisante. A amostra foi homogeneizada até a hemólise completa da solução. O hemolisado pôde ser utilizado após 5 minutos e, no máximo, até 4 horas depois da sua preparação.

- *Padrão de migração das hemoglobinas em pH alcalino (MARENCO-ROWE, 1965)*

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

Tris hidroximetil aminometano	10,2 g
Ácido etilenodiaminotetracético	0,6 g
Ácido Bórico	3,2 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Corante Ponceau

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

Solução descorante

Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	50 mL
Água destilada	1000 mL

Procedimento: As fitas de acetato de celulose foram embebidas (submersas) em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo, e em seguida foram secas em folhas de papel absorvente e colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão (TEB). Os compartimentos eletrolíticos foram conectados com auxílio de tecido absorvente (pano multi-uso). O hemolisado de Hb foi aplicada na fita de acetato a 1,0 cm da extremidade em contato com o pólo negativo, recebendo 300 volts durante 30 minutos.

Interpretação: Após a corrida eletroforética, o padrão de migração das frações hemoglobínicas foram observados, primeiramente, sem coloração. Quando necessários, as fitas foram posteriormente coradas com *Ponceau* para melhor visualização e/ou documentação. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por cinco minutos e, depois, em solução descorante por 30 minutos.

- *Padrão de migração das hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968).*

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 - compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

Na ₂ HPO ₄	2,02g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	7,66g
Água destilada q.s.p	1000 mL

Gel de Ágar-Fosfato

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

Procedimento: Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer e levados ao forno micro-ondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver. Foram pipetados 5,0 mL do gel em lâminas de microscópio que gelificaram à temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel. Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (pano multi-uso), passando 100 volts durante 35 minutos.

- *Quantificação das frações de hemoglobinas por cromatografia líquida e alta performance (HPLC) – Equipamento Ultra 2 (Trinity Biotech).*

Segundo manual de instruções:

Procedimento: Tubos nos quais as amostras de sangue total haviam sido coletadas foram colocadas no equipamento, o qual coletou a amostra hemolisando-a automaticamente antes de injetar no sistema. Quando necessário, pouca quantidade de amostras no todo, essas foram hemolisadas a partir de 5 µL de sangue total e 895 µL de solução diluente fornecida pelo kit de análise. As análises seguiram segundo pré-programação do equipamento.

Interpretação: A quantificação das frações de hemoglobina foi realizada à partir dos valores de porcentagem apresentados em diferentes tempos de retenção, cada qual referente à uma hemoglobina. Os tempos de retenção foram relativizados à partir de valores já conhecidos presentes nos calibradores e controles presentes no kit de análise em questão. Valores de HbA₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,0%, previamente estabelecido pelo fabricante.

APÊNDICE B – Análise molecular para confirmação do diagnóstico de anemia falciforme.

- *Extração de DNA por Fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989)*

Reagentes:

Solução de lise 1 - lise de células vermelhas:

Sacarose 0,32 M	10,95g.
Tris HCl 10 m	1mL.
MgCl ₂ 5mM	0,5 mL
Triton 1% 100x	1 mL.
Água ultrapura autoclavada	100 mL.

Solução de lise 2 - lise de células brancas:

NaCl 0,075 M	10,95g.
EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0)	1mL.
Água ultrapura	500 mL.

Proteinase K (20 mg/mL) - lise proteica:

Proteinase K	20 mg.
Água ultrapura	1mL.

Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1:

Clorofórmio	24 mL.
Álcool isoamílico	1mL.

SDS 10%:

SDS	10 g
Água ultrapura	100 mL

Etanol 70%

Fenol

KCl (2M):

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

Procedimento: Cerca de 500 a 800 uL de amostras de sangue periférico, colhidas em tubos contendo EDTA, foram colocados em microtubos plásticos e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi descartado, deixando-se aproximadamente 300 uL de *pellet* no tubo, e a esse precipitado adicionou-se novamente solução de lise 1, até completar 1,0 mL. As amostras foram agitadas até dissolução total do *pellet* e descansaram por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem centrifugadas novamente por 5 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento de lavagem foi realizado mais uma vez. Ao *pellet* foram adicionados 450 µL de solução de lise 2, 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas em banho-maria a 37°C *overnight* ou a 42°C por 3 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 500 µL de fenol e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6500 rpm durante 5 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo e foram adicionados 500 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por mais 5 minutos a 6500 rpm e o procedimento foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 50 µL de KCL gelado e foi adicionado 500 µL de etanol 100%, também gelado. O tubo foi invertido várias vezes, até ocorrer a precipitação do DNA, e centrifugado por 30 segundos a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA, que ficou aderido ao tubo, com 200 µL de etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os tubos passaram cerca de 15 minutos secando. O DNA foi re-hidratado com 50 µL de água ultrapura e ficou descansando *overnight* em temperatura ambiente, para total solubilização da amostra. As amostras foram estocadas a -20°C para posterior análise.

- *PCR-RFLP para identificação de Hb S* (SAIKI et al., 1985)

A sequência dos oligonucleotídeos, assim como as condições para reação de amplificação e digestão enzimática, estão descritos na tabela abaixo.

Quadro 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, enzima e padrão de digestão utilizados na análise molecular (PCR-RFLP) para identificação da mutação de Hb S

<i>Primers</i> (<i>HBB: c.20A>T</i>)	Tamanho do Amplificado	Enzima de restrição	Padrão de segmentos para cada alelo
P 277 - 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' P 278 - 3' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 5'	382pb	DdeI (5' - C↓TNAG-3')	A: 201pb, 88pb, 87pb e 6pb* T: 288pb, 88pb e 6pb*

*o fragmento de 6pb não é visível durante interpretação dos resultados.

N – bases A,T,C ou G

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

H ₂ O Mili Q	13,0 µL
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL
MgCl ₂ 50 mM	3,0 µL
dNTP 1,25 mM	1,0 µL.
<i>Primer sense</i> 10 µM	2,5 µL.
<i>Primer antisense</i> 10 µM	2,5 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	
Desnaturação	30 segundos	94°C	
Anelamento	30 segundos	55°C	35 ciclos
Extensão	1 minuto	72°C	
Extensão final	10 minutos	72°C	

Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido em banho maria à 37 °C durante 10 minutos.

Digestão enzimática

H ₂ O ultrapura	9,0 µL
Tampão Fast Digest	1,0 µL
Enzima Fast Digest <i>DdeI</i>	1,0 µL
Produto da PCR		5,0 µL

O produto da digestão da enzima de restrição foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, sob corrente elétrica constante de 80 V durante 30 minutos. O gel foi visualizado sob luz UV, após sensibilização com brometo de etídeo.

APÊNDICE C- Rastreamento das variantes genéticas dos genes *NPRL3*, *eNOS* e *HIF1A*

Os oligonucleotídeos, bem como as enzimas de restrição, e os tamanhos dos fragmentos gerados na genotipagem das mutações genéticas desse estudo estão descritas na tabela abaixo

Quadro 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, enzimas e padrões de digestão utilizados na análise molecular (PCR-RFLP) para identificação do SNP rs7203560 (*NPRL3*), VNTR rs61722009 e SNP rs1799983 (*eNOS*) e o SNP rs11549465 (*HIF1A*).

Mutação	Oligonucleotídeos (<i>Primers</i>)	Tamanho o mplificado	Enzima de restrição	Fragmentos originados para cada alelo
<i>NPRL3</i> (T/G) rs7203560	NL3-R: 5' - CCTCACAGTGTGGGATGACA - 3' NL3-F: 3' - ATTAGGTCCCACTCCCAAGC - 5'	321	<i>Dde I</i> (C↓TNAG)	T: 145 pb e 176pb G: 321 pb
<i>eNOS</i> (G/T) rs1799983	eNOS1: 5' - CAGGAGACAGTGGATGGAGG - 3' eNOS2: 3' - CAGTGTCCAACATGCTGCTG - 5'	391	<i>Ban II</i> (5' - RGCY↓C 3')	G: 159pb e 232pb T: 391
<i>eNOS*</i> VNTR 4a4b rs61722009	4a1: 5' - CTATGGTAGTGCCTTGGCTTGAGG - 3' 4b1: 3' - ACCGCCAGGGAAGCTCCGCT - 5'	-----	-----	4a: 187pb 4b: 210 pb
<i>HIF1A</i> (C/T) rs11549465	HIF1A1: 5' - AAGGTGTGGCCATTGTAAAACCTC - 3' HIF1A2: 5' - GCACTAGTAGTTTCTTTATGTATG - 3'	346	<i>Tsp45I</i> (5'- ↓GTSAC -3')	C: 124 pb, 139 pb e 83 pb T: 263 pb e 83 pb

*A mutação 4a4b por tratar-se de um VNTR com repetições de 27pb, a identificação dos diferentes padrões de alelo se deu pelos diferentes tamanhos de banda.

N – bases A,T,C ou G

R – bases A ou G

Y – bases C ou T

S – C ou G

- *PCR-RFLP para o SNP rs7203560 (T/G) do gene NPRL3*

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

H ₂ O Mili Q	15,8 µL
Tampão com MgCl ₂	2,5 µL
dNTP 5 mM	2,0 µL
<i>Primer</i> NL3-R 10 µM	1,0 µL
<i>Primer</i> NL3-F 10 µM	1,0 µL
DMSO (100%)	0,5 µL
Taq Polimerase 5U	0,2 µL
DNA 150 ng/µL	2,0 µL

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturação inicial	5 minutos	95°C	
Desnaturação	30 segundos	94°C	
Anelamento	40 segundos	75°C	35 ciclos
Extensão	1 minuto	72°C	
Extensão final	10 minutos	72°C	

Após a amplificação, o fragmento de 321 pb foi digerido em banho maria à 37 °C durante 5 minutos.

Digestão enzimática

H ₂ O ultrapura	7,0 µL
Tampão Fast Digest	2,5 µL
Enzima FastDigest Dde I (C↓TNAG)	1,0 µL
Produto da PCR	1,0 µL

Os produtos da digestão enzimática foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio, sob corrente constante de 80 V por 35 minutos, e visualizados sob luz UV.

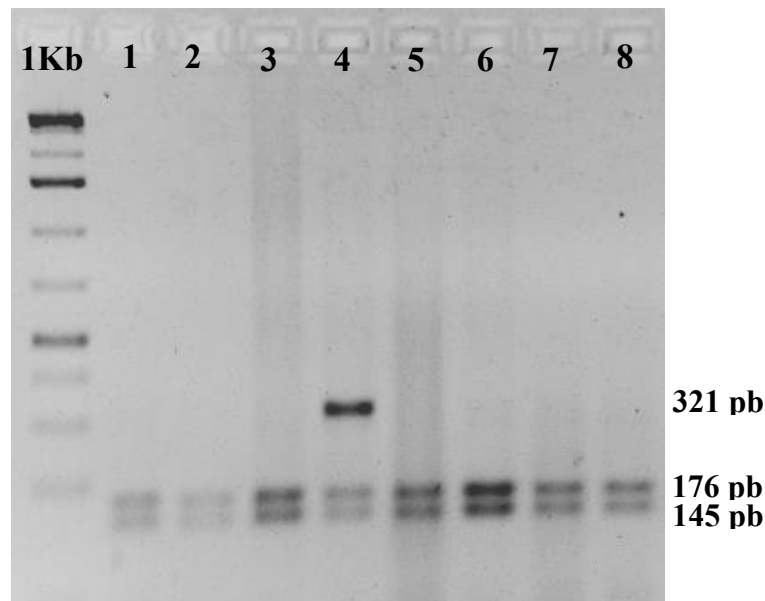
Figura 7: Perfil eletroforético do SNP rs7203560 (T/G) do gene *NPRL3*

Foto de um gel de agarose a 2,5%, submetido à iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para o SNP rs7203560 (gene *NPRL3*). Amostras 1, 2, 3, 5, 6 7 e 8 – homozigoto selvagem (TT) e amostra 4 heterozigoto (GT). Nenhuma das amostras apresentou padrão homozigoto mutante (GG). 1Kb = marcador molecular de 1000pb.

- *PCR-RFLP para o SNP rs7203560 (1772C/T) do gene HIF1A*

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

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

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturação	5 minutos	95°C	
Desnaturação inicial	30 segundos	95°C	
Anelamento	30 segundos	64°C	35 ciclos
Extensão	30 segundos	72°C	
Extensão final	7 minutos	72°C	

Após a amplificação, o fragmento de 346 pb foi digerido em banho maria à 37 °C durante 5 minutos.

Digestão enzimática

H ₂ O ultrapura	7,0 µL
Tampão Fast Digest	2,5 µL
Enzima Fast Digest <i>Tsp45I</i>	1,0 µL
Produto da PCR	1,0 µL

Os fragmentos resultantes da digestão enzimática foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio, sob corrente constante de 80 V por 35 minutos, e visualizados sob luz UV.

Figura 8: Perfil eletroforético do SNP 11549465 (1771 C/T) do gene HIF1A

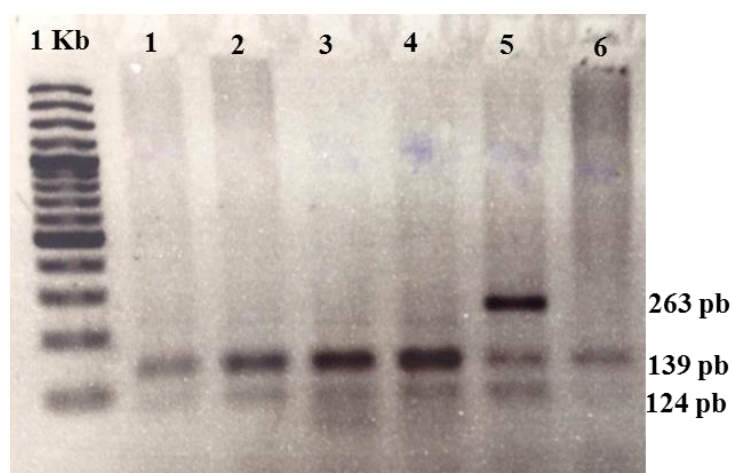


Foto de gel de agarose a 2,5%, submetido à iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para o SNP mutação rs11549465 1772 C/T (gene *HIF1A*). Amostras 1, 2, 3, 4 e 6 – homozigoto (CC) selvagem; Amostra 5, - heterozigoto (CT). 1Kb = marcador molecular de 1000pb.

- *PCR-RFLP para os SNP rs1799983 (894G/T) gene eNOS*

H ₂ O ultrapura	15,2 µL
Tampão sem MgCl ₂	3,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	2,0 µL
DMSO 100%	0,5 µL
dNTP 5 mM	2,0 µL
Primer eNOS-R 10 µM	2,5 µL
Primer eNOS-F 10 µM	2,5 µL
Taq Polimerase 5U	0,2 µL
DNA 150 ng/µL	2,0 µL

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturação	5 minutos	94°C	
Desnaturação inicial	30 segundos	94°C	
Anelamento	40 segundos	65°C	35 ciclos
Extensão	1 minuto	72°C	
Extensão final	10 minutos	72°C	

Após a amplificação, o fragmento de 391 pb foi digerido em banho maria à 37 °C durante 5 minutos.

Digestão enzimática

H ₂ O Mili Q	7,5 µL
Tampão <i>Tango Buffer</i>	1,0 µL
Enzima Fast Digest <i>Ban II</i> (5' - RGCY↓C 3')	0,5 µL
Produto da PCR	5,0 µL

Os fragmentos digeridos foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio, sob corrente constante de 80 V por 35 minutos, e visualizados sob luz UV.

Figura 9: Perfil eletroforético do SNP rs1799983 (894G/T) do gene eNOS

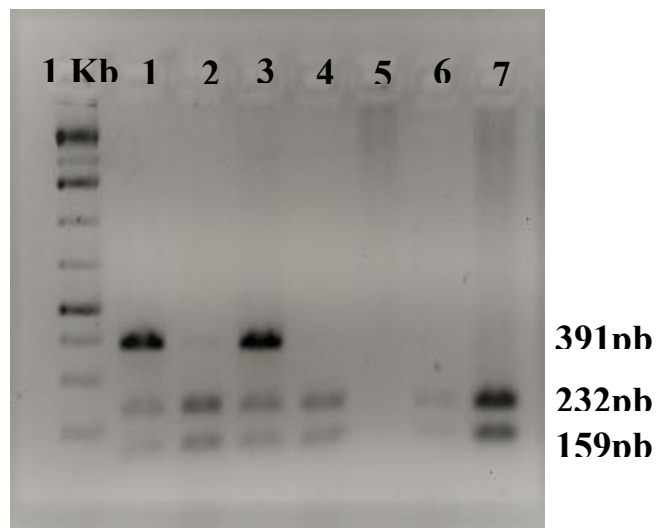


Foto do gel de agarose (2,5%) submetido à iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para o SNP rs1799983 (894G/T - gene *eNOS*). Amostras 2, 6 e 7 - homocigoto para alelo selvagem (GG); amostras 1 e 3 - heterocigotos (GT). Nenhuma das amostras apresentou padrão homocigoto mutante (TT). Na posição referente a amostras 5 podemos observar ausência de amplificação. 1Kb = marcador molecular de 1000 pb.

- *PCR primer específico para o VNTR 4a/4b.*

O protocolo de amplificação foi realizado de acordo com o sugerido por *Nishank*, 2013, com modificações.

H ₂ O Mili Q	15,7 µL
Tampão com MgCl ₂	3,0 µL
dNTP 5 mM	2,0 µL.
<i>Primer</i> 4a4b-R 10 µM	1,0 µL.
<i>Primer</i> 4a4b-F 10 µM	1,0 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturação inicial	5 minutos	95°C	
Desnaturação	30 segundos	94°C	
Anelamento	40 segundos	75°C	35 ciclos
Extensão	1 minuto	72°C	
Extensão final	10 minutos	72°C	

Após amplificação foi possível avaliar a presença dos alelos de acordo com os diferentes tamanhos dos fragmentos originados. Quando na presença do alelo mutante 4a (originado a partir de 4 repetições de 27pb), o fragmento apresentou 187pb enquanto na presença do alelo selvagem 4b (5 repetições de 27pb), foi observado um fragmento de 210pb (Figura 10).

Os fragmentos amplificados correspondentes aos alelos normal e mutante foram analisados em eletroforese em gel de agarose 3,0%, corado com brometo de etídio, sob corrente constante de 80 V por 45 minutos, e visualizados sob luz UV.

Figura 10. Perfil eletroforético da mutação VNRT rs61722009 (4a4b) do gene eNOS

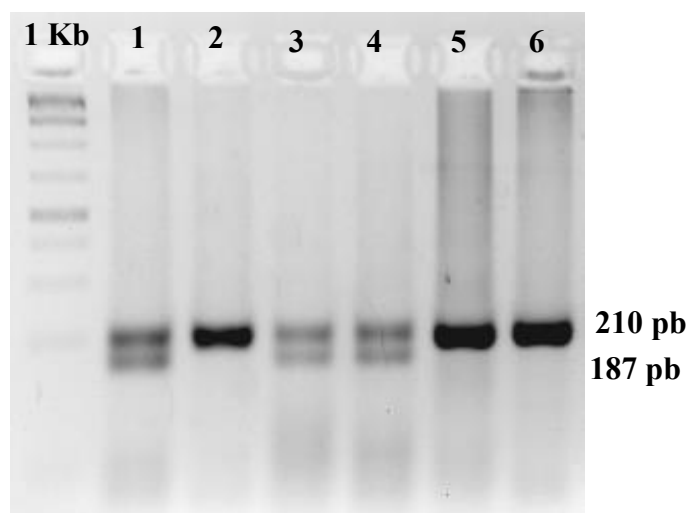


Foto de um gel de agarose a 3,0%, submetido à iluminação UV. Resultado da técnica PCR para a mutação rs61722009 (4a4b- gene eNOS). Amostras 1, 3, e 4 – padrão heterozigoto (4a4b); Amostras 2, 5 e 6 – padrão 4b4b. 1Kb = marcador molecular de 1000pb.

APÊNDICE D – Artigo científico submetido à revista *International Journal of Laboratory Hematology*. ISSN: 1751-553X.

International Journal of Laboratory Hematology



Intravascular hemolysis in pain crises occurrence in sickle cell anemia individuals

Journal:	<i>International Journal of Laboratory Hematology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Nascimento, Patricia; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Instituto de Biociencias Letras e Ciencias Exatas Campus de Sao Jose do Rio Preto, Biologia Silva, Danilo; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Instituto de Biociencias Letras e Ciencias Exatas Campus de Sao Jose do Rio Preto, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental Torres, Lidiane; Universidade Estadual de Campinas Chaves, Nayara; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Instituto de Biociencias Letras e Ciencias Exatas Campus de Sao Jose do Rio Preto, Biologia Okumura, Mésika; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Instituto de Biociencias Letras e Ciencias Exatas Campus de Sao Jose do Rio Preto, Biologia Bellini Junior, Edis; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Tambones, Izabella; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Instituto de Biociencias Letras e Ciencias Exatas Campus de Sao Jose do Rio Preto, Biologia Lobo, Clarisse; State Institute of Hematology "Arthur de Siqueira Cavalcanti" - HEMORIO Domingos, Claudia; Universidade Estadual Paulista (UNESP), Department of Biology, Laboratory of Hemoglobin and Genetics of Hematological Diseases
Keywords:	Hemolysis, Hemolytic Anemia, Sickle Cell, steady state

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

International Journal of Laboratory Hematology

Título: Intravascular hemolysis in pain crises occurrence in sickle cell anemia Individuals

Running title: Hemolysis and pain crises in sickle anemia

Authors:

Patricia P. do Nascimento^a, Danilo G. H. Silva^b, Lidiane S. Torres^c, Nayara A. Chaves^a, Jéssika V. Okumura^a, Izabella L. Tambones^a, Édis Belini Junior^d, Clarisse L. C. Lobo^e, Ricardo L. Dantas-Machado^f, Claudia R. Bonini-Domingos^a.

Co-authors information:

^a Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São Paulo, Brasil

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth
CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil
Telefone: 55 (17) 32212392

^b Departamento de Química e Ciências Ambientais, Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), São Paulo, Brasil

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth
CEP: 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil
Telefone: 55 (17) 32212200 Ramal: 2725

^c Universidade de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil

Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo
CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Telefone: 55 (19) 3521-7000

^d Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brazil

Endereço: Av. Ranulpho Marques Leal, n° 3484, Distrito Industrial
CEP: 79613-000, Três Lagoas, MS, Brasil
Telefone: 55 (67) 3509-3400

^e Instituto de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” (HEMORIO), Rio de Janeiro, Brasil

Endereço: Rua Frei Caneca, Nº 8, Centro
CEP: 20211-030, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil
Telefone: 55 (21) 23328611

^f Universidade Federal Fluminense - Instituto Biomédico - Departamento de Microbiologia e Parasitologia

Endereço: Hernani de Melo 110, São Domingos, Niterói, Rio de Janeiro
CEP: 24.210-130
Telefone: 55 (21) 26292439

Coauthor's email:

Danilo Grünig Humberto da Silva - dangrunig@gmail.com

Lidiane de Souza Torres - lidiane.unesp@gmail.com
Nayara Alves Chaves – nayara.chaves13@gmail.com
Jéssika Viviani Okumura - jessika_okumura@hotmail.com
Edis Belini-Junior - belini.jnr@gmail.com
Izabella Luiza Tambones – tambones.bio@gmail.com
Clarisse Lopes de Castro Lobo - clarisse.lobo@hemorio.rj.gov.br
Ricardo Luiz Dantas Machado – rivemachado@yahoo.com.br
Claudia Regina Bonini-Domingos - claudiabonini@sjrp.unesp.br

Introduction: Individuals with sickle cell anemia (SCA) suffer with unpredictable painful crises that are considered a potential event to trigger fatal complications. The premature destruction of RBCs, in special by intravascular hemolysis (IH), has been suggested as an important risk factor in occurrence of severe clinical conditions. This study reports the hemolytic profile characterization in SCA individuals in relation to occurrence of pain crises. **Methods:** The hemolytic parameters were evaluated in steady state SCA patients (n=103), adults, subdivided in two groups according to the occurrence of the painful episodes (0-2 and ≥ 3). For characterization of the hemolytic profile we measured the plasma Hb levels (a specific marker of IH) and the hemolytic markers used in clinical routine (Rel. Ret, Abs. Ret, LDH, AST and UCB). During the analyses, we compared the parameters between the subgroups and the relationship between each other. **Results:** The plasma Hb levels were 1.3 times higher in the subgroup composed of individuals who had major number of painful crises episodes in the last year (≥ 3 pain crises). This marker of IH also related with the LDH e AST enzymes values, as well as the percentage of reticulocytes that showed higher influence in plasma Hb levels. **Conclusion:** our results suggests that IH is an important hemolytic factor in preventive conduct about crises occurrences in SCA patients. Besides that, the laboratory parameters already used to hemolytic profile characterization in clinical routine of these patients, are also important allies in the characterization of IH.

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) was one of the first hemoglobinopathies to be discovered and represents the most common hereditary hematologic disorder in the world. [1,2]. This genetic disorder, consequent of homozygous inheritance of the hemoglobin S (Hb S), is characterized by chronic hemolytic anemia and severe clinical manifestations reflected in heterogeneous and complex phenotypes. The Hb S is a protein originated from a point mutation in the sixth codon in the β -globin (*HBB*: c. 20A> T-rs334) gene that causes the substitution of glutamic acid for valine ($HBB^{GLU6VAL}$) in the polynucleotide chain [2-3], resulting in a hemoglobin molecule with altered properties. The protein physico-chemical changes culminate in the intraerythrocytic Hb S polymerization under different conditions (dehydration, hypoxemia or acidosis). The recurrent and cyclic process of RBCs sickling added in hypoxic microenvironment, are trigger for the pathophysiological events, leading to vaso-occlusion and hemolysis [4,5] and as consequence, a range of clinical manifestations, the SCA phenotypes [6].

The premature destruction of RBCs, in special by intravascular hemolysis (IH), has been suggested as an important risk factor for occurrence of severe clinical conditions [7-9]. Erythrocyte lysis within the blood vessels lumen provokes extravasation of the intracellular content in the bloodstream. Excess of cell free plasma Hb has a toxic effect triggering adverse reactions [8; 10, 11]. Free heme group allows the iron molecule in ferrous state (valence Fe^{2+}) readily to participate in redox reactions (Fenton reactions), contributing to the oxidative stress. Besides that, the free plasma Hb can also form a stable complex with the nitric oxide (NO) [12], collaborating for a decrease in NO bioavailability and consequent endothelial homeostasis impairment and inflammatory reactions [13]. These events can influence the variable hemolytic profile among the patients and be one of the causes that explain the heterogeneous clinical spectrum of the disease.

Apart of the hemolysis, the sickle-shaped cells cannot flow freely through blood vessels causing vaso-occlusive crises, which lead to ischemia and hypoxia. As a clinical consequence, these individuals with SCA suffer with the occurrence of intense unpredictable painful crises. Although these pain episodes being a hallmark of SCA, it happens in variable frequency among the patients [14,15]. These painful crises are characterized by acute or chronic episodes of pain, without complications and apparent

causes. However, this clinical manifestation is classified as serious condition, even if temporary, being a potential event to trigger fatal complications [6;16]. These events can start during childhood and increase in severity throughout life, being usually the most common cause of hospitalization, adversely impacting the patients' quality of life and their caregivers [17,18].

Among several recent researches that provide new knowledge about SCA, many studies provided advancing in understanding of clinical features and heterogeneous phenotypes, epidemiology and disease pathophysiology [19, 20]. However, the mechanisms of painful crises have not yet been fully clarified neither how they are related with the disease severity. Therefore, they are still being an important focus for research efforts [18; 21].

Since pain in SCA patients is associated with an increase in morbidity, to elucidate the hemolytic and hematological parameters that are related with this clinical manifestation, could help the clinicians counselling and better management and designing of clinical strategies for reducing the frequency of painful crises of patients with SCA. The aim of our study was to characterize and evaluated the hemolytic profile in SCA individuals subdivided according to the frequency of painful crises episodes.

Materials and methods

Subjects

Our study involved 103 SCA patients (44 males and 59 females), adults receiving medical care at the State Institute of Hematology "Arthur de Siqueira Cavalcanti", Rio de Janeiro (HEMORIO). The selected patients were in steady state of the disease [17] at the moment of the blood collection. Namely: no history of hospital admission for acute painful crisis treatment at least four weeks before the sample collection; absence of blood transfusions carried out in <60 days or HbA lower than 10%; and no history of intercurrent illness (infection, inflammation) during the four previous weeks, neither the use anti-inflammatory and antibiotic drugs. We only included individuals without hidroxicarbamide (HC) use. After verbal explanation, all the subjects consented to participate in the study, which was approved by the Supervision and Data Security Board of the institution in accordance with the Brazilian norms and Research Ethics Committee.

Screening and molecular diagnoses for SCA and HbF levels quantifications

Peripheral blood samples (5mL) were collected in tubes with 5% anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA). Part of this sample was centrifuged to isolate the plasma which was stored and part used to characterization of hemoglobin profile performed by electrophoresis on cellulose acetate (pH 8.6) [22] and agar gel (pH 6.2) [23]. Red cells morphology was analyzed by light microscopy with 40x objective [24]. Hemoglobin fractions quantification was obtained by high performance liquid chromatography (HPLC) using the automated *Ultra2* equipment, (Trinity Biotech PLC, Bray, Co Wicklow, Ireland). With this procedure we also obtained the Hb F fraction values, the main genetic hemolytic modulator in SCA pathogenesis.

To confirm the homozygosity for Hb S (SCA diagnosis), DNA was extracted from leukocytes by precipitation method [25] and the samples were submitted to the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) [26] in which the amplified fragment was cleaved using *DdeI* (C↓TNAG) restriction enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA).

Hematological and hemolytic laboratory parameters

Hematological parameters analyzed were: red blood cells count (RBC - M/ μ L), total Hb levels (g/dL), hematocrit (Ht - %) , the mean corpuscular volume (MCV -fL) and mean corpuscular hemoglobin (MCH - pg). All these parameters were obtained by automatized equipment (Cell-Dyn Ruby). To characterize the hemolytic profile, the evaluated parameters were: absolute reticulocytes (Abs. Ret. - k/uL), relative reticulocyte (Rel. Ret - %), unconjugated bilirubin levels (UCB - mm/dL), estimated by 2,4-dichlorophenyl diazonium method; and the enzymes lactate dehydrogenase (LDH - U/L) and aspartate aminotransferase (AST - U/L) measured by UV enzymatic methods (AU680 Chemistry System, Beckman Coulter Inc., Jersey, NJ, USA). The hemolytic laboratory markers considered in this study was selected according to the literature [27].

Plasma cell free Hb levels

The plasma samples that were obtained from centrifugation of the total blood, were stored at -80°C until the cell free plasma hemoglobin (free Hb) quantification. These plasma samples were then thawed carefully on ice and submitted to enzyme-linked immunosorbent assay (Hemoglobin Human ELISA Kit - ab157707) with spectrophotometric detection at 450 nm wavelength (Thermo Plate).

Group's stratification according to painful crises frequencys

A previous study by our research group evaluated several clinical and laboratories parameters which could to influence the disease severity in SCA individuals. Among the results, we observed that the occurrence of three or more painful episodes in the last year were more frequent in intermediate or severe phenotype individuals group [28]. Cause of this, our study group was categorized by the frequency of painful crises occurrence in the last one year previous the study onset. Our study group were subdivided in one subgroup composed by individuals who had no painful crises or had only one or two painful episodes (0-2 crises) and the second subgroup composed of individuals who had three or more painful episodes (≥ 3 crises) in the last year.

Statistic analysis

Statistical analyses were performed using the Statistica 8.0 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), and the GraphPad Prisma version 5.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). We assessed the data normality and homogeneity of variance using the Normal Probability Plots of Residuals and Levene's test, respectively. Hematological and hemolytic parameters were compared between the subgroups using the General Linear Models (GLMs) which allowed us to evaluate the data by combinations of categorical and continuous variables. For these analysis, we compared the parameters (dependent variables) between the subgroups "pain crises" (predictors) with adjustment for gender, age and Hb F values (co-variables). The relation among the hematological markers were performed by Spearman correlation test (non-parametric data) and the General Regression Models (GRM) was used to evaluate the influence of the laboratory hemolytic parameters in free plasma Hb levels (intravascular hemolysis). Data were expressed in mean \pm standard error of mean. We adopted 95% confidence intervals, with a significance level of $p < 0.05$.

Results

To evaluate the hemolytic profile between the two subgroups, we compared the hematological values as well as laboratory markers of hemolysis. Our results showed that only the plasma Hb levels were different, being about 1.3 times higher in individuals who had three or more pain crises during the last year (Table 1). The other markers did not show any difference. Although the hematological parameters were similar between the subgroups, they were out of expected normality values, characterizing chronic hemolytic anemia, a common condition in these patients.

As we noticed that plasma Hb levels was the only hemolytic marker that had different levels according to the frequency of painful episode, we decided to evaluate the relation of this specific intravascular hemolytic marker with the laboratory biochemical parameters already used in the clinical routine to estimate the hemolytic profile of these patients. Our results showed that the percentage of reticulocytes ($r=0.769$; $p<0.001$) as well as the AST ($r=0.329$; $p=0.001$) and LDH ($r=0.772$; $p<0.001$) enzyme levels had positive correlation with the plasma Hb levels (Fig. 1). Among these with positive correlations, when investigated the degree of association, the percentage of reticulocytes was the parameter with higher influence in variation of the free plasma Hb levels ($R=0.129$; $p=0.021$).

Discussion

Our study evaluated the hemolytic profile in frequency of painful crises occurrence in SCA steady state individuals. To the authors' knowledge this is the first study done with Brazilian patients in this field. The values of the hematological and hemolytic parameters evaluated in our study were increased, in special the total Hb that is the most direct indicator of the clinical severity in hemolytic disease. These results were already expected since our study group was formed by SCA individuals in steady state, so therefore patients presenting the own conditions of the disease as chronic hemolysis. [17;29]

After our analysis we can notice that the intravascular hemolysis (IH) was the only parameter with significant difference between the subgroups based on the painful crises episodes. RBC sickling is responsible for structural damage in membrane leading to premature death of the cells by the reticuloendothelial system culminating in chronic extravascular hemolysis in SCA patients. This process can be compounded yet by the IH,

followed by the release of the heme and cell-free plasma Hb, contributing with increase the inflammatory and, somehow, with the mechanisms of pain [21]. Therefore, some studies have suggesting the plasma Hb levels as an important direct marker of IH and a promising prognostic parameter in hemolytic conditions if we consider the IH as a risk factor in severe clinical conditions [8;20]. This idea was corroborated with the results of our study. Besides that, we observed that the laboratory parameters already adopted in clinical routine to estimate the hemolytic profile were related with IH, suggesting the importance of the study them as tools for the profile IH characterization.

The primary acute pathophysiological response to IH is the release of extracellular Hb in plasma, collaborating with increase of inflammatory condition [30,31] and decreasing of NO bioavailability with consequent endothelial damages and vascular dysfunction. These events may have a significant contribution to vasoocclusive processes, the principal causes of painful crises associated with the clinical complications [9;32]. Researches showed that individuals with SCA who had experience of the more than three painful crises per year usually had severe and moderate clinical phenotype [28;33]. The frequency of painful crises, especially vaso-occlusive crises, may be affected by clinical and hematological parameters [29]. For this reason, the control of hemolytic profile as a preventive measure for reduction in frequency of painful episodes should be considered. With our results, we could suggest that the plasma Hb levels, as well as the IH occurrence, is another hemolytic marker that should be consider with attention among the haemolytic laboratories markers already used.

When the relationship among the laboratory markers of hemolysis and the IH is considered, although the correlation between the lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransaminase (AST) enzyme has been observed, the percentage of reticulocytes was the parameter with higher influence. The reticulocyte count it is a important and useful screening test for hemolysis or blood loss. Therefore, its clear that this is an importante hematologic parameters to consider in the severe clinical conditions, like a painful crises, once the acute anemia ocorrence should be consider like an aggravating factor [18;34].

Regarding the enzymes, LDH was observed in higher values, a common finding in SCA steady state patients. The LDH, a marker of nonspecific tissue damage used too as a diagnostic and prognostic factor in chronic hemolysis and other clinical complications.

Most recently this enzyme also has been suggested as an important intravascular hemolytic marker [35, 36], being our study one more evidence for this affirmation once we observed the positive correlation between LDH and plasma Hb levels. In addition, the AST was also related with the plasma Hb levels. This enzyme plays a role in amino acid transamination in cells and acts as an important marker of tissue damage, especially in hepatic tissue [37]. In SCA individuals, the chronic hemolysis condition culminates, sometimes, in hepatic damage due to the excess of the RBC remotion. The evaluation of both enzymes together may be an important tool in the characterization of the hemolytic profile in SCA, if we consider the occurrence of intra- and extravascular hemolysis, even in different proportions according to the clinical condition presented.

The unconjugated bilirubin (UCB) was the only hemolytic parameter not related with the plasma Hb levels. The UCB is a result of the processing of the free heme group in the bloodstream consequent of the exteriorization of the intra-erythrocyte content caused by hemolysis. As 85% of the circulating bilirubin derives from hemoglobin catabolism in the reticuloendothelial organs, this parameter is considered a good marker for extravascular hemolysis and, to a lesser extent, for intravascular hemolysis [29], which can explain the lack of correlation with the plasma Hb levels. However, its relation with the other hemolytic markers suggests that UCB is as important as the others parameters in hemolytic profile characterization.

Painful chronic painful crises affect a majority of SCA patients, and dramatically reduce their quality of life. Unfortunately, the mechanism of pain is still inconclusive in SCA. Genetic factors deserve consideration in future studies, such as the Hb F, which when levels are increased has been associated with reduction in frequency of vaso-occlusive painful crises [38]. Furthermore, the β S haplotypes, which have also been suggested as genetic modulators of hemolytic severity and may explain the clinical variation among SCA individuals, could assisting in predicting clinical severity [39,40].

Conclusion

Our study showed higher levels of plasma Hb in individuals who had three or more painful episodes during the last year. These results suggests that IH may be important hemolytic factor to be considered for preventive conduct about crises occurrences in SCA patients. Added it, significant relationship between the laboratory hemolytic markers (LDH, AST and reticulocytes count) and the plasma Hb levels suggest that these

parameters are important allies in the characterization of intravascular hemolysis and hemolytic profile, as well as in predicting the severity of clinical manifestations such as the vaso-occlusive painful crises.

Acknowledgments

The authors would like to thank the patients who accepted to participate in the study. The Brazilian foundation – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - process: 140533 / 2014-1) for the financial support. The undergraduate student Rafaela Molás, who assisted in the immunoenzymatic analysis, as well as the professor Dr. Sônia Oliani, responsible for the Morphology Laboratory, where the ELISA tests were performed.

References

1. Watson J. A study of sickling of young erythrocytes in sickle cell anemia. *Blood*. 1948;4:465-9.
2. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376: 2018-31.
3. Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11:163-84.
4. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Scientific World Journal* 2009;9: 46-67.
5. Morris CR. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. *Haematologica* 2011; 96: 24-33.
6. Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-Whitley K, Wang WC, Telen MJ; Investigators, Comprehensive Sickle Cell Centers. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol* 2010;1:6-13.
7. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005;3:1653-62.
8. Conran N. Intravascular Hemolysis: A disease mechanism not to be ignored. *Acta Hemat* 2014;132:97-99.
9. Almeida CB, Souza LE, Leonardo FC, Costa FT, Werneck CC, Covas DT, Costa FF, Conran N. Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. *Blood* 2015;6:711-20.
10. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007;1:37-47.

11. Gladwin MT, Kanias T, Kim-Shapiro DB. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. *J Clin Invest* 2012;4:1205-8.
12. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G. Heme degradation and vascular injury. *Antioxid Redox Signal* 2010;2:233-48.
13. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002;12:1383-9
14. Lentz MB, Kautz DD. Acute vaso-occlusive crisis in patients with sickle cell disease. *Nursing* 2017;1:67-68.
15. Darbari DS, Hampson JP, Ichescio E, Kadom N, Vezina G, Evangelou I, Clauw DJ2, Taylor Vi JG, Harris RE. Frequency of Hospitalizations for Pain and Association With Altered Brain Network Connectivity in Sickle Cell Disease. *J Pain* 2015;1:1077-86
16. Novelli EM, Gladwin MT. Crises in Sickle Cell Disease. *Chest* 2016;4:1082-93.
17. Ballas SK. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. *Am J Hematol* 2012;3:338.
18. Lovett PB, Sule HP, Lopez BL. Sickle Cell Disease in the Emergency Department. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017;6:1061-1079
19. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest* 2017;3:750-760.
20. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 2007;1:37-47
21. Tran H, Gupta M, Gupta K. Targeting novel mechanisms of pain in sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017;1:546-555.
22. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. *J Clin Pathol* 1965;6:790-2.
23. Vella, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *American Journal of Clinical Pathology* 1968;49:440-442.
24. BONINI-DOMINGOS CR. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobiopatias e Talassemias. São José do Rio Preto-SP: HN Editora. 2006.
25. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.
26. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia 1985; *Biotechnology* 1992;24:476-80.
27. Nouraie M, Lee JS, Zhang Y, Kanias T, Zhao X, Xiong Z, Oriss TB, Zeng Q, Kato GJ, Gibbs JS, Hildesheim ME, Sachdev V, Barst RJ, Machado RF, Hassell KL, Little JA, Schraufnagel DE, Krishnamurti L, Novelli E, Girgis RE, Morris CR, Rosenzweig EB, Badesch DB, Lanzkron S, Castro OL, Goldsmith JC, Gordeuk VR, Gladwin MT; Walk-PHASST Investigators and Patients. The relationship between the severity of hemolysis,

clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica* 2013;3:464-72.

28. Belini Junior E, Silva DG, Torres Lde S, Okumura JV, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells Mol Dis* 2015;4:321-7.

29. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers* 2015:635670

30. Hoppe CC. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;2:265-86

31. Conran N, Almeida CB. Hemolytic vascular inflammation: an update. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2016;1:55-7.

32. Fernandes Q. Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. *Life Sci* 2017;1:100-108.

33. Ugwu AO, Ibegbulam OG, Nwagha TU, Madu AJ, Ocheni S, Okpala I. Clinical and Laboratory Predictors of Frequency of Painful Crises among Sickle Cell Anaemia Patients in Nigeria. *J Clin Diagn Res* 2017;6:EC22-EC25.

34. Meier ER, Fasano RM, Levett PR. A systematic review of the literature for severity predictors in children with sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2017;65:86-94.

35. Ballas SK. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood* 2013;1:243-4.

36. García-Morin M, López-Sangües C, Vázquez P, Álvarez T, Marañón R, Huerta J, Cela E. Lactate Dehydrogenase: A Marker of the Severity of Vaso-Occlusive Crisis in Children with Sickle Cell Disease Presenting at the Emergency Department. *Hemoglobin* 2016;6:388-391.

37. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2006.

38. Bhatnagar P, Keefer JR, Casella JF, Barron-Casella EA, Bean CJ, Hooper CW, Payne AB, Arking DE, Debaun MR. Association between baseline fetal hemoglobin levels and incidence of severe vaso-occlusive pain episodes in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013;10:E125-7.

39. Gabriel A, Przybylski J. Sickle cell anaemia: a look at global haplotype distribution. *Nat Educ* 2010; 3: 2.

40. Okumura JV, Silva DG, Torres LS, Belini-Junior E, Barberino WM, Oliveira RG, Carrocini GC, Gelaleti GB, Lobo CL, Bonini-Domingos CR. Inheritance of the Bantu/Benin haplotype causes less severe hemolytic and oxidative stress in sickle cell anemia patients treated with hydroxycarbamide. *J Hum Genet* 2016;7:605-11.

Table 1: Hematological and hemolytic parameters in steady state sickle cell anemia individuals

Sickle Cell Anemia						
Pain crises occurrence in last one year						
	0 - 2		≥ 3		p value**	Normality values
	N=78		N= 25			
	Mean (±SEM)		Mean (±SEM)			
Gender	45 ♀	33 ♂	14♀	11 ♂	-----	-----
RBC (M/ul)	2.50 (± 0.05)		2.61 (± 0.11)		0.721	4.5 – 6.0*
Hb (g/dL)	8.05 (± 0.12)		8.23 (± 0.26)		0.724	12.0 –16.0*
Ht (%)	23.51 (± 0.83)		23.39 (± 0.77)		0.690	36.0 – 50.0*
MCV (fL)	90.19 (± 0.83)		89.85 (± 2.44)		0.888	80.0 – 94.0*
MCH (pg)	31.73 (± 0.34)		31.72 (± 0.96)		0.825	27.0 – 32.0*
Rel. Ret (%)	11.10 (± 0.42)		11.08 (± 0.25)		0.797	0.5 – 1.5%
Abs. Ret (K/uL)	278.43 (± 9.50)		281.29 (± 29.05)		0.993	-----
LDH (U/L)	720.0 (± 52.46)		874.00 (± 35.70)		0.574	480
AST (U/L)	47.4 (± 1.90)		52.05 (± 6.03)		0.129	< 31
UCB (mm/dl)	2.60 (± 0.14)		2.60 (± 0.32)		0.782	< 0.7
Plasma Hb (ng/mL)	80.89 (± 3.80)		107.00 (± 13.09)		0.002	-----

SEM= standard mean error. RBC: red blood cells, Hb: total hemoglobin; Ht: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobina.

Rel. Ret = relative reticulocytes; Abs. Ret. = Absolutes reticulocytes; LDH = lactato desyrogenase; AST: aspartato aminotrasnferase; UCB= unconjugated billirubin; Plasma Hb = cell free plasma hemoglobin.

*Values of normality were estimated based on the range of the lowest and highest normal values for men and women.

**Statistical test: *GLM*; p <0.05 considered significant.

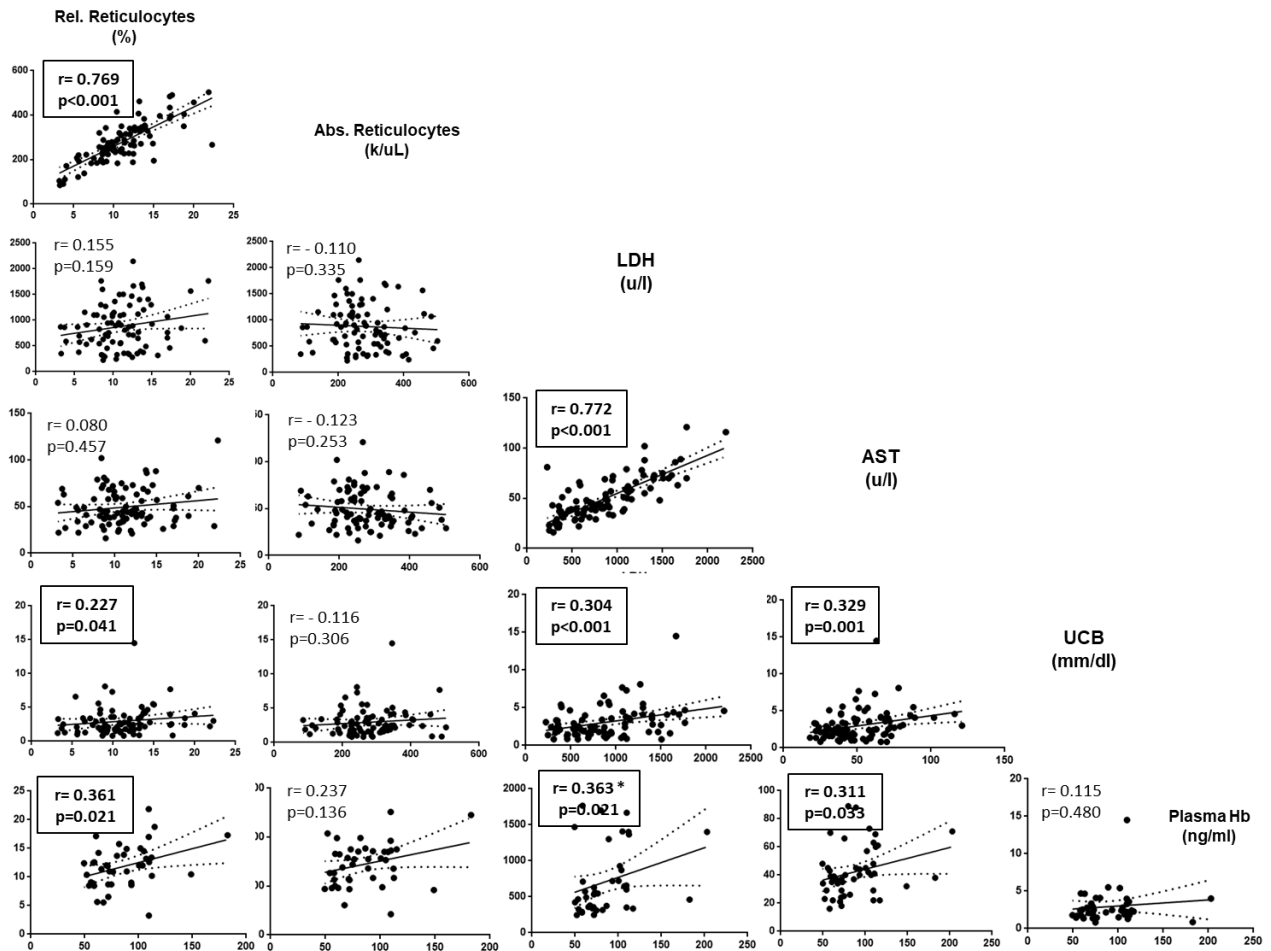


Figure 1: Correlation among laboratories hemolytic markers and plasma Hb levels. $p < 0.05$ was considered significant. Moderate positive correlation was observed between plasma Hb with Rel.Ret ($r = 0.361$; $p = 0.021$), LDH ($r = 0.363$; $p = 0.021$) and AST ($r = 0.311$; $p = 0.033$). Among the laboratory markers, the higher positive correlation were observed between the Rel.Ret x Abs. Ret ($r = 0.769$; $p < 0.001$), LDH x AST ($r = 0.772$; $p < 0.001$), and moderate correlation between UCB with Rel.Ret ($r = 0.227$; $p = 0.041$), LDH ($r = 0.304$; $p < 0.001$) and AST ($r = 0.329$; $p < 0.001$) Statistical analysis: Spearman's correlation.

APÊNDICE E – Short communication à ser submetido à revista *Hemoglobin*

Tracking by phylogenetic footprinting of transcription factors involved with the SNP rs7203560 and the possible influence on the expression. Of the alpha globin

Izabella L. Tambones^a, Patricia P. Nascimento^a, Larissa P. R. Venancio^b and Claudia R. Bonini-Domingos^a

^a*Hemoglobin Laboratory and Genetics of Hematologic, Department of Biology, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – São Paulo State University – UNESP, São José do Rio Preto, Brasil;* ^b*Center for Biological and Health Sciences - CCBS, Federal University of Western Bahia – UFOB, Barreiras, Brazil.*

*Corresponding author's contact: tambones.bio@gmail.com – Rua Cristovão Colombo, 2265; 15054-000 – São José do Rio Preto, SP; Brasil. Telefone: (17) 99187-0032

Abstract

Located near the alpha-globin cluster, the gene *Nitrogen Permease Regulator-Like 3 (NPRL3)* comprehends the alpha globin gene regulatory sites (HS-40, HS-33 and HS-48) in its intronic regions. The single nucleotide polymorphism *rs7203560*, of the gene *NPRL3*, has been associated with lower hemolytic rates in individuals with sickle cell anemia (AF). Thus, transcription factor (FT) binding sites, molecular modulating units, were investigated by means of phylogenetic footprinting in order to evaluate the influence of this variant on the expression of the globin alpha gene. Using the *NPRL3* sequences in Hominidae species, our investigation pointed to six sites of FTs in the SNP region. The presence of these sites suggests the participation of factors, directly or indirectly, in the regulation of alpha-globin genes, and consequently, in the association of SNP with hemolytic rates in individuals with AF.

Keywords: *NPRL3*; sickle cell anemia; phylogenetic footprinting

Introduction

The sickle cell anemia (AF) is a complex monogenic disease, resulting from a point mutation (HBB.c20A>T) in homozygosis in the beta globin gene (configuring the β^S allele), is one of the most severe forms of sickle cell anemia, and is characterized by

having great clinical heterogeneity among its individuals. Among the main pathophysiological processes that trigger the clinical conditions of AF, we highlight the vessel occlusion and the chronic hemolytic process [1]. The latter has been suggested as an independent risk factor in favor of more severe clinical conditions, and may be involved with complications such as leg ulcer [2] and the pulmonary hypertension [3]. The search for genetic markers that may characterize and exert influence on the hemolytic profile in people with AF has been shown to be a promising tool in clinical trials and prognostic approaches for hemolytic anemia [3,4], including AF among them.

Among recent studies, the association of the single nucleotide polymorphism (SNP) *rs7203560*, located in the first intron of the *Nitrogen Permease Regulator-Like 3* (*NPRL3*) gene, located in the short arm of chromosome 16 (16p13.3), with lower hemolytic rates in individuals with AF [4]. It is known that this gene has high conservation rates throughout its evolutionary process, being related to the globin clusters from the origin of the vertebrate organisms, preceding the spatial separation of the preceding the spatial separation of α and β globin families [5]. Thus, the *NPRL3* gene is evolutionarily conserved, especially among birds and mammals, both in terms of gene constitution, and in its order, orientation and chromosomal position, which is close to the alpha-globin cluster [6].

Also, among its intronic regions were registered the presence of some of the main regulatory elements of the alpha globin genes (*HBA₁* e *HBA₂*), the HS-40, HS-33 e HS-48 [7,8]. These elements act in the process of regulating the gene expression of the HBAs, being of great importance for the transcription process and consequently hemoglobin synthesis [9]. In addition, one study also pointed out that the SNP *rs7203560* showed linkage disequilibrium with polymorphic variants, SNPs *rs9926112*, *rs7197554* and

rs13336641, which are located between these regulatory sites, and in positions in evidence, as for example this latter SNP that is located next to a CTCF binding site [4].

The dynamic character of the genome is reflected in the importance of the variation of its non-coding portion, which is responsible for acting on the mechanisms of articulation and gene expression. Thus, understanding the functioning, dynamics and mechanisms related to gene regulation has also become the focus of molecular studies [7,8]. Among these, the proteins involved in the machinery of gene regulation, transcription factors (TFs) have been highlighted as important functional units to these processes [7,10,11].

An important approach that has been increasingly used in order to analyze TF-binding sites is the analysis of phylogenetic footprinting [12]. This is a comparative genomic analysis which admits that high-degree non-coding sequences among different species may indicate specific TF binding sites [12]. Also, through this methodology, it is possible to draw a parallel between the degree of conservation of these sites and a possible functional importance involving the respective TFs indicated according to the analyzed biological problem [13].

Thus, by searching for TFs that have binding sites in the polymorphic region of the *NPRL3* gene, it is suggested to establish possible relations between the factors with potential action in this region and the regulation of *HBA*s. This study aimed to track, in silico, sites of TFs links in the region of *SNP rs7203560*, *NPRL3* gene, by means of phylogenetic footprinting.

Material and Methods

The tracking of TFs that have binding sites in the *SNP rs7203560* region was made through the phylogenetic footprinting analysis. In this way, binding sites of TFs

conserved throughout the evolutionary process of Hominidae were traced, possessing possible functional importance to the expression of the globin genes and/or to hematopoietic mechanisms [13]. The tool used was the *VISTA tools* (<http://www-gsd.lbl.gov/vista/>), that performs comparative genomics analysis and allows the alignment of genomes of several species. Sequence alignment and conservation assessment were carried out on the basis of the local program BLAT (BLAST - *like alignment tool*), with the purpose of identifying homology between species. Sequences related to the first intron of the *NPRL3* gene available in databases (*National Center of Biotechnology Information - NCBI* and *European Bioinformatics Institute - EMBL*) of the species representing anthropomorphic apes: *Pan troglodytes* (GenBank: NC_006483.4), *Pongo abelii* (GenBank: NC_012607.1), *Macaca mulatta* (GenBank: NC_027912.1) e *Gorilla gorilla* (GenBank: NC_018440.1). All sequences were compared to each other and to the sequence of *Homo sapiens* (Gen Bank: NG_029669.1), also obtained through the abovementioned databases, containing the ancestral allele of the *SNP rs7203560*.

The data were processed and globally aligned through the *MLAGAN* and visualized in the *VISTA Browser* software, in which the alignment is characterized by the definition of different colors and patterns of peaks and valleys. Then the conserved regions were evaluated using the *default* parameters of the program. In order to identify the binding sites of TFs, the *rVISTA* software associated to the database *TRANSFAC* (913 *motifs*) was used, by means of comparative sequence analysis [14,15].

Results and Discussion

All the intronic regions were aligned and presented more than 70% identity in at least 100 base pairs when compared between species. At first it was believed that due to the absence of functional restriction, non-coding regions (such as the intronic regions)

would not be on selection effect and consequently would have lower conservation rates, evolving faster. However, several studies have demonstrated the existence of certain non-coding regions conserved in the human genome [16-18], meeting the first result observed in our analysis. Thus, when showing an intrinsic region with conserved sites, it is possible to suggest a possible evolutionary importance of the studied intron fragment.

We identified 80 *motifs* conserved among the species analyzed in the polymorphic region of interest. From this total, TFs whose roles are directly or indirectly related to aspects approaching the hematopoietic and globin expression processes were selected (Figure 1), being: *Ecotropic viral integration site 1*, which has a function related to the proliferation process and renewal of adult and embryonic hematopoietic cells in mice [19]; *Kruppel-like factor 1 (KLF1)* which is a specific erythroid activator (unique to 26 mammals), acting on the molecular mechanisms of induction of globin gene expression [20,21]. In addition, *KLF1* recognizes CACCC box sites, which in turn are regions found in the globin promoter region [5,22]; *signal transducer and activator of transcription 1 e 3* in which, together, they exhibit roles as hematopoietic negative regulators when in circumstances in which erythroid progenitor cells present erythropoietin as differentiation inducing factor [23]; *SMAD Family member 1* which promotes the signaling of bone morphogenetic proteins, in which the relationship between these two molecules is associated with the function temporarily defined to Smad1 in restricting the expansion of early hematopoietic progenitor cells [24]; and *YY1 factor transcriptional*, which acts as a controlling factor for the expression of the *HBA* gene in less derived mammals (when compared to the species studied here), in order to form an extended promoter in the region of the binding site of this factor, the exon 1 of *HBA*. Moreover, the latter was previously pointed out, by a work of our group, as a candidate factor involved in the expression of the *gamma globin* gene [11].

The relation of selected factors as possible candidate TFs is different from those previously found [7], where regions conserved within the *NPRL3* gene region were investigated. Twenty-four multispecies conserved sequences were found in these regions, which were separated into five general groups: promoters, other regulatory elements, splicing elements, previously unidentified exons, and unknown elements [7]. Considering a possible increase of motifs in the database of TF sites we used as one of the main variants associated to this difference of results, as well as the specificity in the suggestion of the related TFs and the restriction of the gene region investigated, we emphasize the originality of the data obtained here.

Studies suggest that the SNP has a relationship with the expression of lower hemolytic rates, suggesting an effect homologous to that caused by lower Alpha-thalassemia in AF [4]. Taking into account the results obtained with our analysis, and knowing the importance of TFs as a possible modulating unit of gene expression, the relationship reported in the literature involving the presence of SNP and hemolytic rates may be justified in view of the action (or loss of action) of the TFs reported here.

By means of the phylogenetic footprinting, we found conserved TF binding sites in Hominidae species that may be directly or indirectly related to the hematopoiesis process, as well as the regulation of globin genes, especially *HBAs*. Also, it is noted that the screened factors exhibit their binding sites when in the presence of the wild-type allele SNP rs7203650 and that these sites may cease to exist when in the presence of the mutant allele, consequently removing a TF potential acting in that region, which may be associated with the results pointed out previously in another study [4].

These results are enlightening. However, it is important to note that new studies, in vitro and in vivo, using the candidate TFs should be done, aiming at a better

understanding of the roles played by these elements in the regulation of globin genes, as well as their relationship to diseases associated with chronic hemolysis.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

References

- [1] Steinberg MH. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Sci. World J.* 2008; 8:1295–1324.
- [2] Sawhney H, Weedon J, Gillette P, et al. Prädilektion des Malleolus medialis beim mit hämolytischer Anämie assoziierten Ulcus cruris. *Vasa.* 2002;31:191–193.
- [3] Taylor JG, Ackah D, Cobb C, et al. Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* 2008;83:6–14.
- [4] Milton JN, Rooks H, Drasar E, et al. Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* 2013;161:270–278.
- [5] Philipsen S, Hardison RC. Evolution of hemoglobin loci and their regulatory elements. *Blood Cells, Mol. Dis.* 2017;0–1.
- [6] VYAS P, VICKERS MA, PICKETTS DJ, et al. Conservation of Position and Sequence of a Novel, Widely Expressed Gene Containing the Major Human α -Globin Regulatory Element. *Genomics.* 1995;29:679–689.
- [7] Hughes JR, Cheng J-F, Ventress N, et al. Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102:9830–9835.
- [8] Iarovaia O V., Ioudinkova ES, Petrova N V., et al. Evolution of α - and β -Globin genes and their regulatory systems in light of the hypothesis of domain organization of the genome. *Biochem.* 2014;79:1141–1150.

- [9] Kielman MF, Smits R, Hof I, et al. Characterization and Comparison of the Human and Mouse Dist1/ α -globin Complex Reveals a Tightly Packed Multiple Gene Cluster Containing Differentially Expressed Transcription Units. *Genomics*. 1996;32:341–351.
- [10] Yost SE, Shewchuk B, Hardison R. Nuclear protein-binding sites in a transcriptional control region of the rabbit alpha-globin gene. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13:5439–5449.
- [11] de Souza Carrocini GC, Venancio LPR, Bonini-Domingos CR. Screening of Transcription Factors Involved in Fetal Hemoglobin Regulation Using Phylogenetic Footprinting. *Evol. Bioinform. Online*. 2015;11:239–244.
- [12] Ganley ARD, Kobayashi T. Phylogenetic footprinting to find functional DNA elements. *Methods Mol. Biol.* 2007;395:367–380.
- [13] Nobrega MA, Pennacchio LA. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *J. Physiol.* 2004;554:31–39.
- [14] Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W273–W279.
- [15] Dubchak I, Munoz M, Poliakov A, et al. Whole-Genome rVISTA: A tool to determine enrichment of transcription factor binding sites in gene promoters from transcriptomic data. *Bioinformatics*. 2013;29:2059–2061.
- [16] Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*. 2009;458:223–227.
- [17] Woolfe A, Goodson M, Goode DK, et al. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol.* 2005;3.
- [18] Harmston N, Baresic A, Lenhard B. The mystery of extreme non-coding conservation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2013;368:20130021–20130021.
- [19] Kataoka K, Sato T, Yoshimi A, et al. Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term

- multilineage repopulating activity. *J. Exp. Med.* 2011;208:2403–2416.
- [20] Grieco AJ, Billett HH, Green NS, et al. Variation in Gamma-Globin Expression before and after Induction with Hydroxyurea Associated with BCL11A, KLF1 and TAL1. Wilber AC, editor. *PLoS One.* 2015;10:e0129431.
- [21] Kim YW, Yun WJ, Kim A. Erythroid activator NF-E2, TAL1 and KLF1 play roles in forming the LCR HSs in the human adult β -globin locus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016;75:45–52.
- [22] Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13:2776–2786.
- [23] Kirito K, Uchida M, Takatoku M, et al. A novel function of Stat1 and Stat3 proteins in erythropoietin-induced erythroid differentiation of a human leukemia cell line. *Blood.* 1998;92:462–471.
- [24] Cook BD, Liu S, Evans T. Smad1 signaling restricts hematopoietic potential after promoting hemangioblast commitment. *Blood.* 2011;117:6489–6497.

Figure

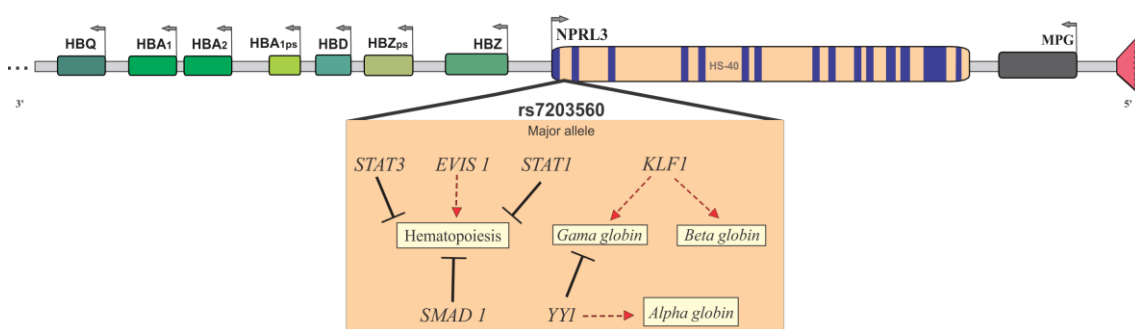


Figure caption

Figure 1: Scheme of the organization of the genes located on the short arm of chromosome 16. The telomeric and subtelomeric regions (pink) are represented on the far right, followed by the gene *N-methylpurine DNA glycosylase* (MPG),

Nitrogenpermeaseregulator-like 3 (NPRL3 – with exons represented in blue), and those belonging to the alpha-globin cluster: *hemoglobinsubunitzeta (HBZ)*; *hemoglobinsubunitzeta pseudogene (HBZps)*; *hemoglobinsubunit delta (HBD)*; *hemoglobinsubunit alpha pseudogene 1 (HBAs1)*; *hemoglobinsubunit alpha 1 e 2 (HBA1 e HBA2)*; *hemoglobinsubunittheta (HBQ)*. The SNP region, in the first intron, is highlighted and within the framework the presence of binding site of the main transcriptional factors is pointed out, as well as the interaction between them and the regulation of hematopoiesis and globin genes: *Signal transducer and activator of transcription 3 e 1 (STAT3 e STAT1)*; *Ecotropic viral integration site 1 (EVIS1)*; *Kruppelikefactor 1 (KLF1)*; *SMAD familymember 1 (SMAD 1)*; *YY1 transcription fator (YY1)*. Lines in black: repression; Dotted red lines: activation.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética – CEP Hemorio

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 04 de junho de 2009.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

O projeto, "*Estudo de Polimorfismos Genéticos em Pacientes portadores de Doença Falciforme e sua associação com complicações clínicas*", registro CEP HEMORIO 151/08, foi **aprovado** pelo Comitê desta Instituição, conforme a Resolução CNS 196, de 10/outubro de 1996, após análise das respostas às pendências.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até 04/12/2009 e ao término do estudo.

Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Laura Jane ou Thais Oliveira) pelo telefone 2299-9442, ramal 2141, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

Laura Jane Gonçalves Neumann
Coordenadora do CEP HEMORIO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Frei Caneca, 8 – Centro – Rio de Janeiro – CEP 20211-030
Tel.: (21) 2299-9442 R. 2215 – Fax: 2242-4250 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética – CEP IBILCE/UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência de marcadores de hipóxia e da síntese de óxido nítrico no processo hemolítico em Anemia Falciforme (HbSS) e Malária vivax.

Pesquisador: Patrícia Pereira do Nascimento

Área Temática: Genética Humana;

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

Versão: 1

CAAE: 39906314.9.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 948.491

Data da Relatoria: 01/02/2015

Apresentação do Projeto:

As anemias hemolíticas são doenças caracterizadas pela lise ou destruição anormal de eritrócitos, sendo classificadas em hereditárias como a Anemia Falciforme (AF) ou adquiridas como a Malária. O presente projeto visa estudar marcadores bioquímicos e genéticos relacionados ao processo hemolítico, que acompanha a evolução dessas duas anemias.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar os e marcadores genéticos e plasmáticos relacionados a via da hipóxia e na produção de óxido nítrico, durante o processo hemolítico. Serão utilizadas amostras de sangue de dois grupos; (A) 300 indivíduos de 18 a 50 anos, portadores de anemia falciforme e (B) 200 indivíduos com mais de sete anos, diagnosticados com malária provocada por *Plasmodium vivax*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora indicou que os indivíduos da pesquisa estão sujeitos a risco mínimo referente a possibilidade de dor e hematoma no local da punção venosa decorrente da coleta da amostra sanguínea. Como benefícios, serão realizados testes laboratoriais quanto a presença de hemoglobinopatias e marcadores genéticos e plasmáticos para os indivíduos constantes na

Endereço: CRISTOVÃO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: ibilce@ibilce.unesp.br

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
LETRAS E CIÊNCIAS
EXATAS/CAMPUS DE SÃO



Continuação do Parecer: 948.491

pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com elevado mérito científico e com relevância a saúde pública, que pretende realizar estudo na área de genética e de doenças tropicais. Destaca-se a relevância de investigações relacionadas a malária e anemia falciforme, duas doenças negligenciadas e de grande ocorrência no Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora propõe a dispensa da apresentação de dois TCLE. Para a pesquisa envolvendo amostras obtidas dos indivíduos do grupo A, foi aprovado o TCLE 151/08 pelo CEP HEMORIO. O grupo da pesquisadora têm convênio de colaboração didática e científica com o HEMORIO formalizado pelo processo 054/33/01/2012. Para a pesquisa envolvendo os indivíduos do grupo B, a pesquisadora utilizará amostras de sangue previamente coletadas e armazenadas. O acesso às amostras dependem da colaboração com o Instituto Evandro Chagas, por meio do co-orientador da pesquisadora, Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado. A pesquisadora apresenta o parecer consubstanciado do CEP IEV/SVS/MS, o qual demonstra manifestação favorável ao projeto de pesquisa "Infecção pelo Plasmodium vivax no município de Anajás, Estado do Pará: Associação de polimorfismos dos genes do receptor do Linfócito T, Toll-like e citocinas envolvidas na resposta imune com os aspectos clínicos". O parecer do CEP IEV/SVS/MS foi confeccionado em 21 de maio de 2014 e o projeto de pesquisa é de responsabilidade do co-orientador da pesquisadora. Tendo em vista, as justificativas apresentadas pela pesquisadora para a dispensa dos TCLE, sugiro também a não obrigatoriedade da confecção e análise de um novo TCLE.

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

nada a declarar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Proposta Inicial completamente adequada.

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2285
Bairro: JARDIM NAZARETH CEP: 15.054-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3221-2428 Fax: (17)3221-2500 E-mail: liliane@ibica.unesp.br

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética – Instituto Evandro Chagas

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Infecção pelo *Plasmodium vivax* no município de Anajás, Estado do Pará: Associação de polimorfismos dos genes do receptor do Linfócito T, Toll-like e citocinas envolvidas na resposta imune com os aspectos clínicos

Pesquisador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 5

CAAE: 20123413.0.0000.0019

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 654.999

Data da Relatoria: 29/05/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa que visa identificar a ocorrência de polimorfismos em genes envolvidos com a resposta imune em indivíduos residentes do município de Anajás. O protocolo foi previamente apreciado por este CEP, sendo considerado pendente devido a necessidade de ajustes metodológicos, adequações no TCLE e apresentação de Termos de Assentimentos para menores de 18 anos. No entanto, as recomendações elencadas no parecer anterior foram devidamente atendidas no presente protocolo.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa pretende identificar a ocorrência de polimorfismos nos genes envolvidos na resposta imune, hemoglobinas e de diferentes Interferoninas em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* e de indivíduos não infectados em um município do Estado do Pará, visando identificar possíveis associações com os níveis de citocinas, parasitemia, anemia e aspectos clínico-epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador "a avaliação não trará nenhum benefício direto para os voluntários do projeto e nenhum benefício direto para a comunidade, mas os resultados deste irão ajudar a

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N
 Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000
 UF: PA Município: ANANDEUA
 Telefone: (01)3214-2237 Fax: (01)3214-2233 E-mail: seac@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 054.009

melhorar as ferramentas moleculares para o diagnóstico da malária nas unidades de saúde e para uso em programas de controle da malária no futuro. Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir na identificação e participação efetiva de genes humanos na modulação da resposta imune, essenciais no estabelecimento de estratégias de imunização contra a doença. Especificamente, estes resultados poderão ainda contribuir na identificação de polimorfismos em genes do hospedeiro que possam estar envolvidos na produção de citocinas e seus níveis e, portanto, acarretar em maior susceptibilidade e/ou resistência à malária. Serão garantidos sigilo e confidencialidade dos dados/informações obtidos. Todos os dados e resultados serão armazenados nos computadores do pesquisador principal, do pesquisador da UFPA (Prof. Dr. Antônio Carlos Vallinoto), do pesquisador da UEPA (Profa. Dra. Ana Ventura) e da pesquisadora da UNESP (Profa. Dra. Claudia Bonini). A troca de informações entre os mesmos será realizada por email confidencial e/ou pendrives.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com mérito científico e com relevância a saúde pública, que pretende realizar estudo na área de imunogenética da infecção por *P. vivax* em residentes do município de Anajás-PA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados todos os termos obrigatórios exigidos, incluindo: folha de rosto devidamente assinada, anuências das instituições de pesquisa e acordo de compartilhamento das amostras, anuência dos pesquisadores, TCLE, anuência da SMS de Anajás, projeto detalhado e Termos de Assentimento.

Recomendações:

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 466/12 Publicada no DOU nº 12, 13 de junho de 2013 – Seção 1 – Página 59 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N
Bairro: Levilândia CEP: 67.030-000
UF: PA Município: ANANINDEUA
Telefone: (91)3214-2237 Fax: (91)3214-2235 E-mail: snc@iec.pa.gov.br

Continuação do Parecer: 654.999

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa-CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma proposta.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

ANANINDEUA, 21 de Maio de 2014

Assinado por:
Edvaldo Carlos Brito Loureiro
(Coordenador)

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor