

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente a
partir de 02/03/2020.



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

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 homozigoto 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 homozigoto 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).

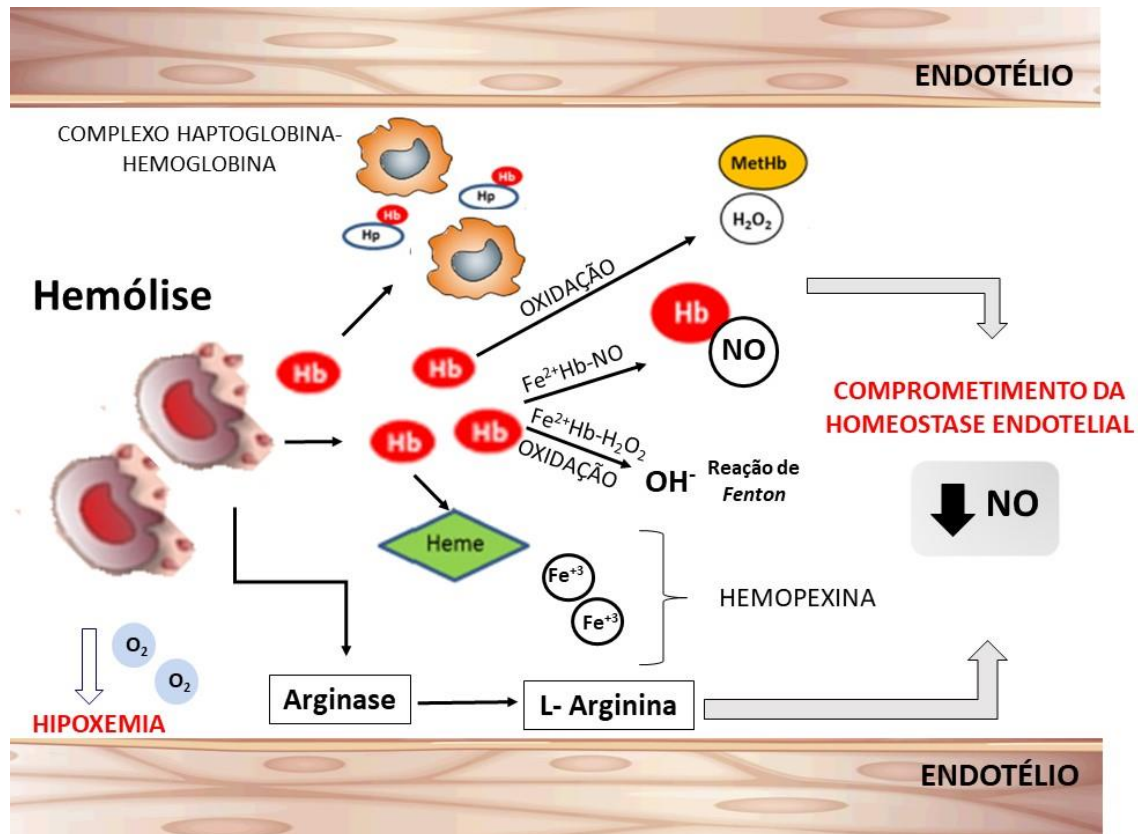
A ruptura do eritrocitário, com a consequente diminuição da concentração de Hb circulante, ocasiona a diminuição das concentrações de oxigênio (O_2) disponíveis na circulação. Essa condição, caracterizada pela baixa concentração de O_2 nas células e tecidos, é denominada hipoxemia e compromete a integridade 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 hemoexina 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

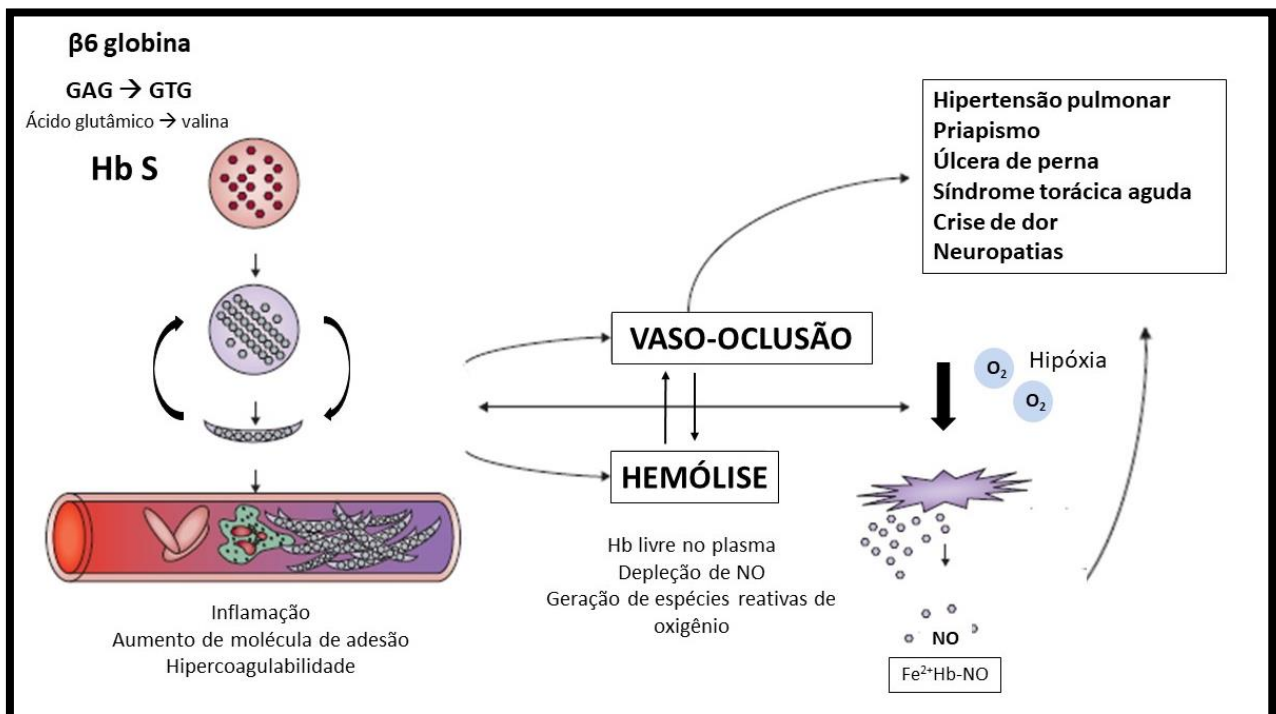
A anemia falciforme (AF), condição homocigota para a HbS, é uma afecção genética de clínica grave, caracterizada por indivíduos com fenótipos heterogêneos e complexos (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2007; NGO; STEINBERG, 2015), considerada uma das afecções monogênicas mais conhecidas e estudadas em todo mundo. 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*

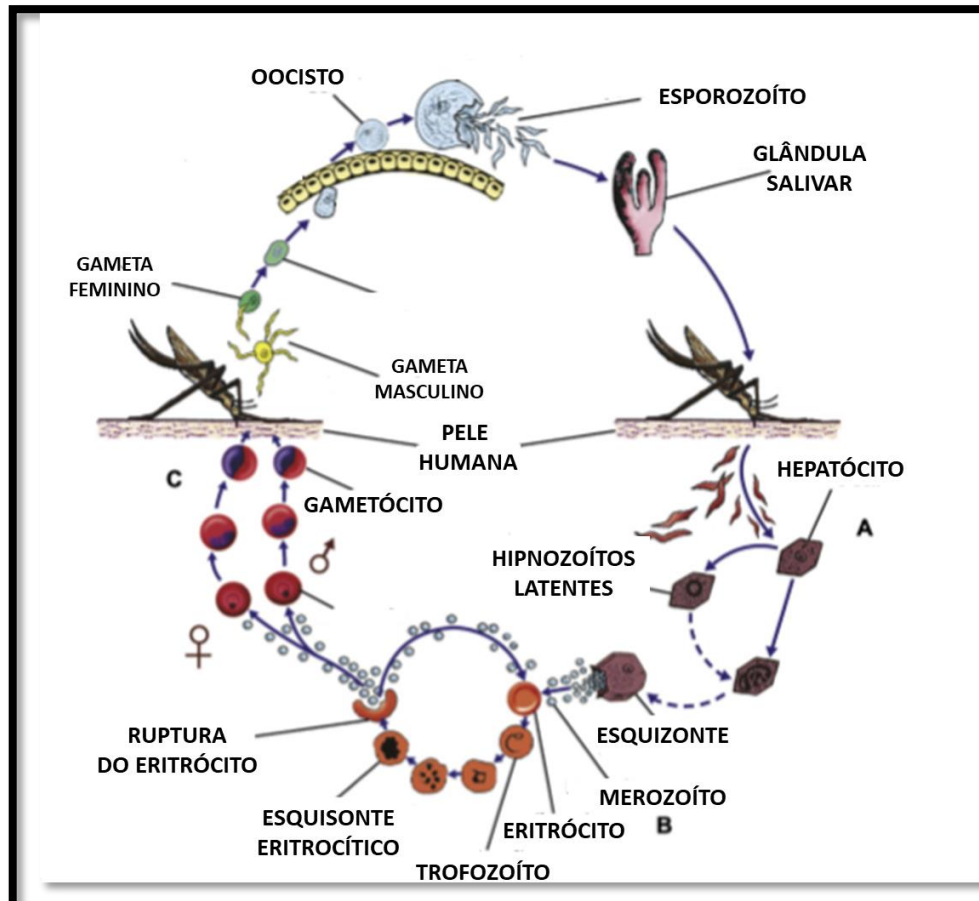
A malária humana é considerada a doença parasitária mais importante em todo o mundo por estar relacionada com as maiores causas de morbidade e mortalidade em muitos países tropicais e subtropicais (QUINTERO et al., 2011; RAPOSO et al., 2013; WHO, 2016). Uma infecção de manifestação principalmente aguda, 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 (RHBDF1, 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.

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 oh 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.