



Lidiane de Souza Torres

Polimorfismos nos genes *TGFB* e *TNFA* e sua relação com crises vaso-oclusivas e disfunção endotelial em pacientes com anemia falciforme

Lidiane de Souza Torres

Polimorfismos nos genes *TGFB* e *TNFA* e sua relação com crises vaso-oclusivas e disfunção endotelial em pacientes com anemia falciforme

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Humana junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Milton Artur Ruiz

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP
2012

Lidiane de Souza Torres

Polimorfismos nos genes *TGFB* e *TNFA* e sua relação com crises vaso-occlusivas e disfunção endotelial em portadores da anemia falciforme

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Humana junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Milton Artur Ruiz
Professor Assistente Doutor
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, USP

Profa. Dra. Silma Maria Alves de Melo
Coordenação Geral de Sangue e
Hemoderivados/DAE/SAS - Ministério da Saúde

Profa. Dra. Isabeth da Fonseca Estevão
Professor Assistente Doutor
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2012.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do Ministério da Saúde, FUNDARJ, CAPES e CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Valdete, a quem agradeço pela vida e amor que incondicionalmente dedicaram a mim, por todos os ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e por todo o apoio as minhas decisões e a minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus passos.

A toda minha família, principalmente aos meus pais, Antônio e Valdete, por todo amor, carinho, apoio e compreensão, e aos meus tios, Ney, Neide, Vanilda e Vanda, pelo incentivo e por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), Belini, Danilo, Gisele, Larissa, Tiago, Maria Isabel, Jéssika, Paula, Willian, Isabela, Marina R, Nathália, Jéssica, Tayrone, Renan, Mariana, Cristina, Vinicius, Bárbara, Marina N, Vanessa U, Vanessa C, Isabeth, Eliana, Ludmilla e João Vitor pelos ensinamentos, pelo companheirismo e por todos os momentos de diversão.

A todos os amigos da faculdade que de alguma forma fizeram parte desta etapa da minha vida, agradeço pelo apoio e por todo o carinho e amizade. Um agradecimento especial a Gisele, Larissa, Haruo, Andréia, Kamila, Guilherme Scagion, Guilherme Sabino, Dayane, Ariela e Julia, pela grande amizade e pela proximidade nos momentos de alegria e de tristeza também. Também agradeço aos meus grandes amigos Karen e Gabriel, que mesmo distantes foram imprescindíveis à esta conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Milton Artur Ruiz e a minha coorientadora Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos, pela oportunidade, pela amizade, pela paciência, pela confiança, por todos os ensinamentos e por acreditar no meu crescimento.

E, por fim, ao CNPq pela minha bolsa de estudos.

"A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma."

John Ruskin

RESUMO

A anemia falciforme (AF) afeta milhões de pessoas em todo o mundo e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade. Apresenta uma série de manifestações fenotípicas, que são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, resultando em fenótipos diversificados, e um tratamento bastante eficaz tem sido o uso de hidroxiureia (HU), que ameniza os sintomas e a necessidade de transfusão sanguínea e hospitalização. Estudos de associação de genomas já demonstraram que polimorfismos genéticos podem desempenhar influência no perfil clínico dos pacientes, assim como na resposta destes à medicação. Os polimorfismos -308G/A no gene *TNFA* e -509C/T no gene *TGFB* aumentam a produção das suas respectivas citocinas que atuam principalmente em vias inflamatórias e são fortes candidatos a estarem envolvidos na ocorrência de episódios vaso-oclusivos característicos da doença. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar a frequência desses polimorfismos em portadores da AF, com e sem o uso de HU, e possível relação com a gravidade das manifestações clínicas da doença. Foram obtidas 588 amostras de sangue periférico de pacientes com doença falciforme em acompanhamento no HEMORIO. A partir destas, foram separados, aleatoriamente, 240 pacientes com AF, cujo genótipo foi confirmado por procedimentos laboratoriais clássicos e moleculares. Estes foram genotipados para os polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFB*) por PCR-RFLP. Os dados hematológicos e clínicos parciais de 118, dos 240 pacientes, foram obtidos por questionário e consulta aos prontuários médicos e banco de dados. A frequência do polimorfismo -308G/A foi de 0,83 em homozigose e 17,92% em heterozigose. Para o polimorfismo -509C/T, foi de 6,25% e 48,33%, respectivamente. Não foi observada associação entre o polimorfismo -308G/A e as manifestações clínicas nos pacientes avaliados. Com relação ao polimorfismo -509C/T, o alelo mutante (T) mostrou-se como um fator de risco para a ocorrência de episódio de dor (OR=2,8; p=0,0284) e como um fator protetor para o desenvolvimento de necrose avascular (OR=0,31; p=0,0232). Os resultados obtidos podem refletir a influência do polimorfismo -509C/T no aumento de processos vaso-oclusivos, em decorrência do recrutamento de moduladores inflamatórios e aumento da expressão de moléculas de adesão, levando às crises de dor, da mesma forma que seu efeito angiogênico e osteogênico poderiam diminuir as chances de ocorrência de necrose avascular nesses pacientes.

Palavras-chave: Hb S. Doença falciforme. Hidroxiureia. Polimorfismos.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) affects millions of people worldwide and is associated with high morbidity and mortality. This affection shows various phenotypic manifestations, which are influenced by genetic and environmental factors, resulting in many phenotypes, and the most effective treatment has been the use of hydroxyurea (HU), which improves the symptoms and the requirement for blood transfusion and hospitalization. Genome association studies have shown that genetic polymorphisms may play role on the clinical profile of patients, as well as in response to these medications. The -308G/A and -509C/T polymorphisms, in *TNFA* and *TGFB* genes respectively, increase production of their cytokines, which act on inflammatory pathways and are strong candidates to be involved in the occurrence of vaso-occlusive episodes. The aim of this study was to determine the frequency of these polymorphisms in patients with AF, with and without HU utilization, and possible relationship with the severity of clinical manifestations of disease. We obtained 588 peripheral blood samples of patients with sickle cell disease at HEMORIO. From these, were separated at random 240 patients with AF, whose genotype was confirmed by classical and molecular laboratory procedures. They were genotyped for polymorphisms-308G/A (*TNFA*) and-509C/T (*TGFB*) by PCR-RFLP. The hematological and clinical data of 118 of the 240 patients, were obtained by questionnaire and medical records and database. The frequency of polymorphism -308G/A was 0.83% in homozygous and 17.92% in heterozygous. For the polymorphism -509C/T, was 6,25% and 48.33% respectively. No association between polymorphism -308G/A and clinical manifestations in patients was found. Concerning the polymorphism-509C/T, the mutant allele (T) proved to be a risk factor for the occurrence of pain episodes (OR=2.8, p=0.0284) and as a protective factor for avascular necrosis development (OR=0.31, p=0.0232). The results may reflect the influence of the polymorphism-509C/T in vaso-occlusive processes increase, due to the recruitment of inflammatory modulators and increased expression of adhesion molecules, leading to painful crises. The angiogenic and osteogenic effects could decrease the chances of avascular necrosis in these patients.

Key-words: Hb S. Sickle cell disease. Hydroxyurea. Polimorphisms.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação esquemática da organização da família gênica das globinas alfa e beta nos cromossomos 16 e 11, respectivamente. | 18 |
| Figura 2. Representação esquemática da expressão dos genes da globina ao longo do desenvolvimento..... | 18 |
| Figura 3. Distribuição geográfica do alelo β^S | 20 |
| Figura 4. Representação esquemática da fisiopatologia da anemia falciforme..... | 22 |
| Figura 5. Três principais efeitos da hidroxiureia no organismo e seus benefícios na prevenção da vaso-oclusão e vasculopatias..... | 27 |
| Figura 6. Gel de poliacrilamida para análise do polimorfismo -308G/A (<i>TNFA</i>)..... | 45 |
| Figura 7. Gel de agarose para análise do polimorfismo -509C/T (<i>TGFB</i>)..... | 47 |
| Figura 8. Frequência das manifestações clínicas no grupo de estudo. | 52 |
| Figura 9. Relação entre o uso ou não de HU e a ocorrência das manifestações clínicas... . | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos -308G/A (<i>TNFA</i>) e -509C/T (<i>TGFB</i>) nos pacientes com anemia falciforme..... | 49 |
| Tabela 2. Frequências alélicas encontradas para o polimorfismo -308G/A (<i>TNFA</i>) em alguns estudos recentes e em banco de dados, em comparação com as frequências obtidas no presente estudo. | 50 |
| Tabela 3. Frequências alélicas encontradas para o polimorfismo -509C/T (<i>TGFB</i>) em alguns estudos recentes e em banco de dados, em comparação com as frequências obtidas no presente estudo. | 51 |
| Tabela 4. Perfil hemoglobínico e hematológico dos 118 pacientes do grupo de estudo com informações clínicas relatadas. | 53 |
| Tabela 5. Perfil enzimático dos 118 pacientes do grupo de estudo com informações clínicas relatadas..... | 54 |
| Tabela 6. Perfil hemoglobínico e hematológico dos pacientes com AF com e sem uso de HU. | 56 |
| Tabela 7. Perfil enzimático dos pacientes com AF com e sem uso de HU. | 57 |
| Tabela 8. Risco relativo de desenvolvimento das manifestações clínicas para os pacientes com anemia falciforme portadores dos polimorfismos -308G/A no gene <i>TNFA</i> e -509 no gene <i>TGFB</i> | 58 |
| Tabela 9. Ocorrência das manifestações clínicas com relação ao genótipo para o polimorfismo -308G/A no gene <i>TNFA</i> e o uso de HU..... | 59 |
| Tabela 10. Ocorrência das manifestações clínicas com relação ao genótipo para o polimorfismo -509C/T no gene <i>TGFB</i> e o uso de HU. | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| Hb | hemoglobina |
| et al. | e outros |
| ERO | espécies reativas de oxigênio |
| NO | óxido nítrico |
| Hb F | hemoglobina fetal |
| Hb A | hemoglobina a (normal) |
| Hb A ₂ | hemoglobina a ₂ |
| DF | doença falciforme |
| AF | anemia falciforme |
| PHHF | persistência hereditária de hemoglobina fetal |
| STA | síndrome torácica aguda |
| AVE | acidente vascular encefálico |
| HU | hidroxiureia |
| e cols | e colaboradores |
| <i>TGFB</i> | fator transformante do crescimento beta (gene) |
| TGF- β | fator transformante do crescimento beta (citocina) |
| <i>TNFA</i> | fator de necrose tumoral alfa (gene) |
| TNF- α | fator de necrose tumoral alfa (citocina) |
| MHC | complexo de histocompatibilidade |
| EDTA | ácido etinoadaminotetracético |
| TEB | tris-EDTA-borato |
| HPLC | cromatografia líquida de alta performance |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| rpm | rotações por minuto |
| dNTP | desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| RFLP | polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição |
| pb | pares de base |
| DP | desvio padrão |
| VCM | volume corpuscular médio |

| | |
|------|---|
| HCM | hemoglobina corpuscular média |
| CHCM | concentração de hemoglobina corpuscular média |
| LDH | lactato desidrogenase |
| AST | transaminase oxalacética |
| ALT | alanina aminotransferase |
| BT | bilirrubina total |
| BD | bilirrubina direta |
| BI | bilirrubina indireta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--|---|
| ζ | gene zeta |
| α | gene alfa |
| ϵ | gene epsilon |
| γ^G | gene gama glicina |
| γ^A | gene gama alanina |
| δ | gene delta |
| β | gene beta |
| mmHg | milímetros de mercúrio |
| g | gramas |
| mL | mililitros |
| g/dL | gramas por decilitro |
| cm | centímetros |
| NaCl | cloreto de sódio |
| Na_2HPO_4 | fosfato de sódio dibásico anidro |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | fosfato de sódio monobásico monohidratado |
| KCl | cloreto de potássio |
| q.s.p. | quantidade suficiente para |
| nm | nanometros |
| U | unidade |
| L | litros |
| M | molar |
| mM | mili molar |
| mg/mL | miligramas por mililitros |
| μL | microlitros |
| MgCl_2 | cloreto de magnésio |
| $\text{ng}/\mu\text{L}$ | nanogramas por microlitros |
| μM | micromolar |
| fL | fentolitros |
| pg | picrogramas |
| $\text{K}/\mu\text{L}$ | mil por microlitros |
| $\text{M}/\mu\text{L}$ | milhões por microlitros |
| U/L | unidades por litro |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução..... | 17 |
| 1.1 | A molécula de hemoglobina | 17 |
| 1.2 | Hemoglobina S | 19 |
| 1.3 | Anemia falciforme | 20 |
| 1.4 | Complicações clínicas da anemia falciforme..... | 23 |
| 1.5 | Tratamento com hidroxureia na anemia falciforme..... | 25 |
| 1.6 | Aspectos genéticos na anemia falciforme..... | 27 |
| 1.6.1 | Gene <i>TNFA</i> | 28 |
| 1.6.2 | Gene <i>TGFB</i> | 29 |
| 2 | Objetivos | 32 |
| 2.1 | Objetivo geral | 32 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 32 |
| 3 | Material e Métodos..... | 34 |
| 3.1 | Casuística | 34 |
| 3.2 | Estudo das hemoglobinas..... | 34 |
| 3.3 | Análise molecular | 39 |
| 3.4 | Análises estatísticas | 47 |
| 4 | Resultados | 49 |
| 4.1 | Frequência dos polimorfismos -308G/A (<i>TNFA</i>) e -509C/T (<i>TGFB1</i>) | 49 |
| 4.2 | Informações clínicas | 51 |
| 4.3 | Uso de hidroxureia..... | 54 |
| 4.4 | Relação entre os polimorfismos e a clínica | 57 |
| 5 | Discussão | 62 |
| 6 | Conclusão | 67 |
| 7 | Referências..... | 69 |
| 8 | Anexos | 79 |
| 8.1 | Anexo I | 79 |
| 8.2 | Anexo II..... | 80 |

1. Introdução

1 Introdução

1.1 A molécula de hemoglobina

A hemoglobina (Hb) humana é uma proteína globular tetramérica, cuja função principal é o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso (WALKER et al., 1990; NELSON; COX, 2006). Além do transporte de gases, a Hb atua também na manutenção do equilíbrio ácido-base, na detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e no transporte de óxido nítrico (NO), para garantir a capacidade antioxidante do sangue e a oxigenação dos tecidos (REISCHL et al, 2007). A molécula é formada por quatro subunidades, cada uma com duas frações: protéica, representada pelas cadeias globínicas, e prostética, formada pelo grupo heme, que contém o átomo de ferro, responsável pela ligação aos átomos de oxigênio (HONIG; ADAMS III, 1986; MANCA; MASALA, 2008).

A fração protéica da Hb é formada por duas cadeias do tipo alfa, codificadas por genes localizados no braço curto do cromossomo 16 (5'- ζ - α_1 - α_2 -3'), em uma região de aproximadamente 25kb, e duas cadeias do tipo beta, codificadas por um grupo de genes localizados no braço curto do cromossomo 11 (5'- ϵ , γ^G , γ^A , δ e β -3'), em uma região de cerca de 50kb (Figura 1). Os genes estão presentes em ambos os cromossomos na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento. As Hb predominantes do período embrionário são as Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$). Durante a vida fetal, a Hb predominante é a Hb fetal (Hb F) ($\alpha_2\gamma_2$), porém, no período pós-natal, esta é gradualmente substituída pela Hb A ($\alpha_2\beta_2$), majoritária, e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), minoritária (Figura 2). Estabilizadas as taxas de produção das cadeias, na fase adulta, um indivíduo sem hemoglobinopatias apresenta 96% a 98% de Hb A, de 2,5% a 3,5% de Hb A₂ e Hb F em concentrações mínimas, que vão de 0 a 1,0% (HONIG; ADAMS III, 1986; BONINI-DOMINGOS, 2006; MANCA; MASALA, 2008).

Mutações que alteram a estrutura protéica das Hb interferem nas suas características fisicoquímicas, originando as chamadas Hb variantes. Essas variantes são ocasionadas, em geral, por mutações de ponto, que podem alterar a matriz de leitura e resultar na substituição de um aminoácido por outro de carga diferente (STEINBERG et al., 2001; BAIN, 2011). No banco de dados de depósito de Hb variantes até fevereiro de 2012, foram encontradas 1139 variantes de Hb já descritas (HUISMAN et al., 2012). Em

muitos casos, essas mutações são silenciosas, mas, em outros, podem interferir na estabilidade da molécula funcional, conduzindo a quadro clínico perceptível, como no caso da Hb S em homozigose (STEINBERG et al., 2001; MANCA; MASALA, 2008).

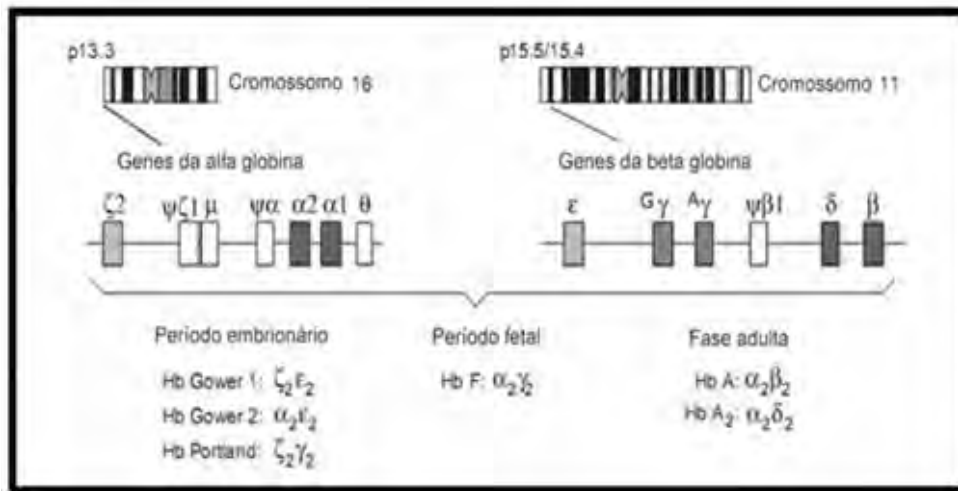


Figura 1. Representação esquemática da organização da família gênica das globinas alfa e beta nos cromossomos 16 e 11, respectivamente (modificado de STEINBERG et al., 2009).

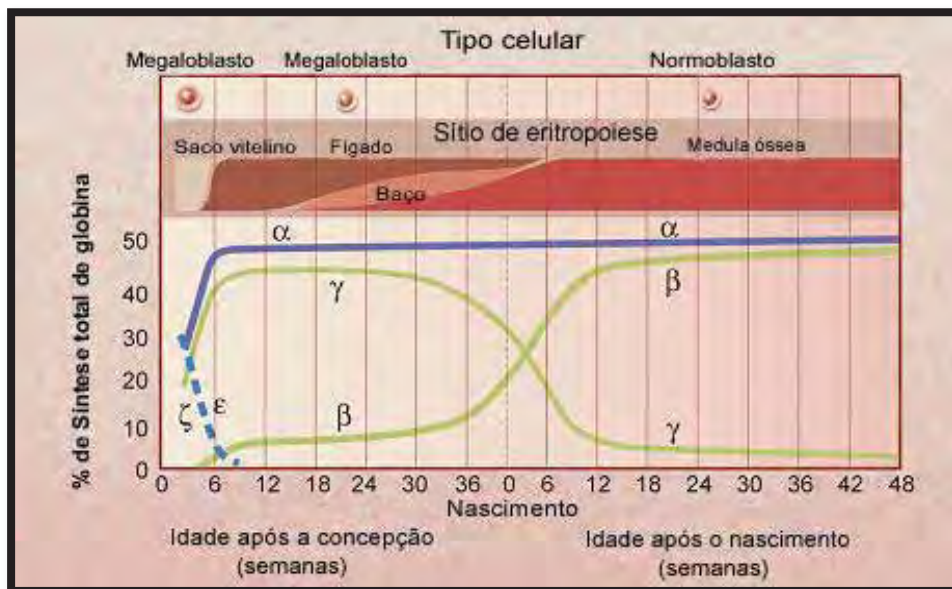


Figura 2. Representação esquemática da expressão dos genes da globina ao longo do desenvolvimento. A figura mostra a porcentagem de produção de cadeias atingida, além dos tipos celulares e os principais locais de síntese (modificado de SCHECHTER, 2008).

1.2 Hemoglobina S

A mutação pontual no gene β globina, com a troca de uma adenina por uma timina ($\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$), resulta na substituição de ácido glutâmico por valina na posição seis da cadeia beta ($\text{GLU}\beta\text{6VAL}$), acarretando características estruturais e bioquímicas diferentes da Hb normal e caracterizando a Hb S (HONIG; ADAMS, 1986; FRENETTE; ATWEH, 2007). Moléculas de Hb S são normais quanto à capacidade de ligação ao oxigênio, porém, essa mutação produz um motivo hidrofóbico na Hb desoxigenada, que leva à ligação entre duas cadeias beta de duas moléculas de Hb, produzindo polímeros que se estendem e preenchem o eritrócito, alterando sua arquitetura e flexibilidade e distorcendo a forma do eritrócito para um aspecto de foice (NUSSBAUM et al., 2002; NELSON; COX, 2006; BUNN, 1997; BRITTENHAM; SCHECHTER; NOGUCHI, 1985; NOGUCHI, 1988 apud REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A polimerização da Hb S dentro das hemácias leva a múltiplas alterações da célula, como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a interrupção da ligação da membrana com proteínas do citoesqueleto. Assim, as principais alterações moleculares que ocorrem no interior da célula refletem-se na membrana e têm como consequências: aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana, encurtando sua sobrevivência na circulação; lesões microvasculares; depleção de NO, que contribui para vaso-constricção e inflamação; e ativação da coagulação (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

As anemias hemolíticas hereditárias que têm em comum a presença da Hb S caracterizam a doença falciforme (DF) (LOBO et al, 2007), que inclui a anemia falciforme (AF), as interações com talassemias, como a Hb S/beta-talassemia, e as associações com outras variantes de Hb, formando os duplos heterozigotos, como a Hb SC (BONINI-DOMINGOS, 1993).

Devido a sua origem ter se dado em continente africano e como reflexo da contribuição do africano na formação étnica de várias populações, por causa da migração, a Hb S apresenta-se amplamente distribuída em todo o mundo (Figura 3). A AF, forma mais grave da doença, afeta milhões de pessoas em todo o mundo e está associada com grandes taxas de morbidade e mortalidade, e estima-se que cerca de 2% da população mundial carregam genes responsáveis pela doença. Em cada ano, nascem, aproximadamente, 300.000 crianças com AF, sendo mais de 200.000 casos só na África

(WHO, 2006; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

No Brasil, a distribuição da Hb S é bastante heterogênea, dependendo da região e da composição negroide da população, sendo maior nas regiões norte e nordeste, cuja prevalência de heterozigotos está entre 6% e 10%. Nas regiões sul e sudeste, a prevalência está em torno de 2% a 3%. De acordo com o Ministério da Saúde, estima-se o nascimento de uma criança com AF para cada mil recém-nascidos vivos (CANÇADO; JESUS, 2007). No Rio de Janeiro, por exemplo, há estimativa de 4% de portadores assintomáticos da Hb S na população e o nascimento de uma criança com DF a cada 1.200 nascimentos, o que equivale a existência de mais de 13 mil indivíduos com DF no Estado (CANÇADO; JESUS, 2007; IBGE, 2010).

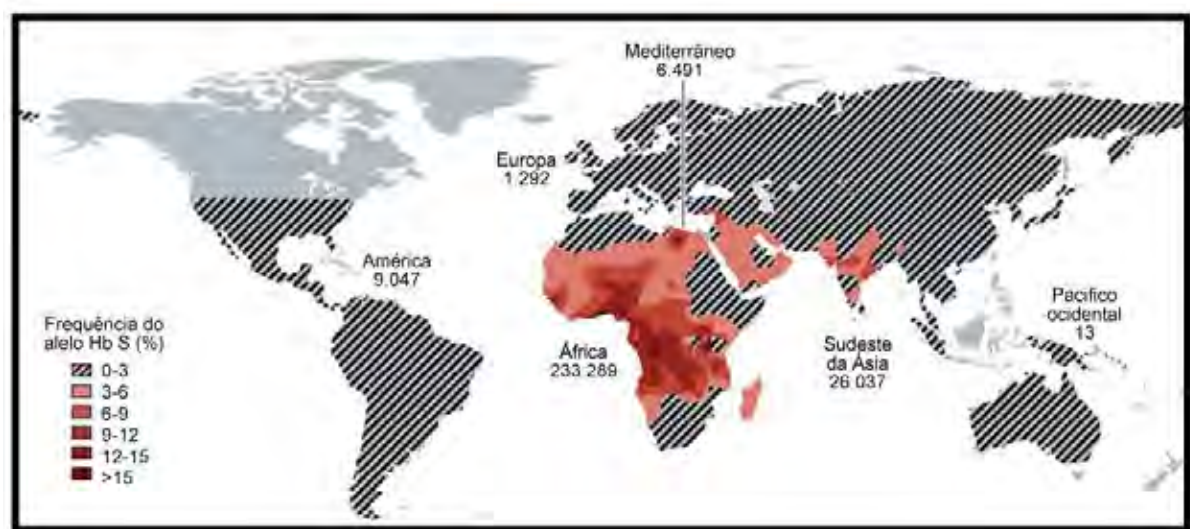


Figura 3. Distribuição geográfica do alelo β S. Os dados são estimativas da OMS (Organização Mundial da Saúde) para o número anual de indivíduos afetados com Hb SS, Hb SC e Hb S/beta talassemia por região (modificado de REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

1.3 Anemia falciforme

A AF, caracterizada pela presença da Hb S em homozigose, apresenta uma série de manifestações clínicas, como anemia, episódios recorrentes de vaso-oclusão, crises de dor, infecções, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, infarto, priapismo, osteonecrose, insuficiência renal, úlcera de perna, retinopatias e doenças cardíacas, que são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, resultando em fenótipos diversificados (FRENETTE; ATWEH, 2007; STEINBERG, 2008; DRISS et al., 2009; AKINSHEYE; KLINGS, 2010).

Os principais determinantes da gravidade da doença são a taxa e a extensão da polimerização da Hb S, que são influenciadas pela concentração de Hb S ou de Hb F, tais como a co-herança de talassemia alfa ou a persistência hereditária de Hb F (PHHF) (BUNN, 1997 apud REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Eritrócitos contendo Hb S sofrem falcização reversível na circulação sanguínea, de acordo com ciclos de oxigenação e desoxigenação, mas, nem sempre esse processo resulta em vaso-oclusão, pois o tempo médio de permanência dos eritrócitos em trânsito é relativamente pequeno, quando comparado ao tempo para a ocorrência da sua polimerização. Dessa forma, a falcização é um fenômeno necessário, mas não suficiente para a vaso-oclusão. Fatores que retardam o fluxo sanguíneo, como a adesão de células ao endotélio, podem promover a obstrução dos vasos, impedindo a passagem das células falcizadas pelos capilares (KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009). O processo inflamatório dentro da microvasculatura pode desempenhar importante papel na vaso-oclusão e na estimulação do estresse oxidativo e da produção de citocinas. Estas, por sua vez, podem participar de vários mecanismos que contribuem para a patogênese vaso-oclusiva da doença, incluindo ativação do endotélio vascular, adesão de leucócitos e hemácias ao endotélio e alteração da apoptose das células endoteliais (CHIANG; FRENETTE, 2005).

Os níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios encontram-se aumentados na AF e a contagem elevada de leucócitos está associada à progressão e gravidade da doença e ao risco de morte precoce. Além disso, a expressão de moléculas de adesão está aumentada nesses pacientes, quando comparada a dos indivíduos normais. Estudos “in vivo” mostraram que, em camundongos falciformes em condições de normóxia, ainda sim, observa-se comprometimento da hemodinâmica vascular, com aumento de leucócitos circulantes e diminuição da velocidade de rolamento, processos esses agravados pela hipóxia (KAUL; HEBBEL, 2000; FINNEGAN et al., 2007) (Figura 4).

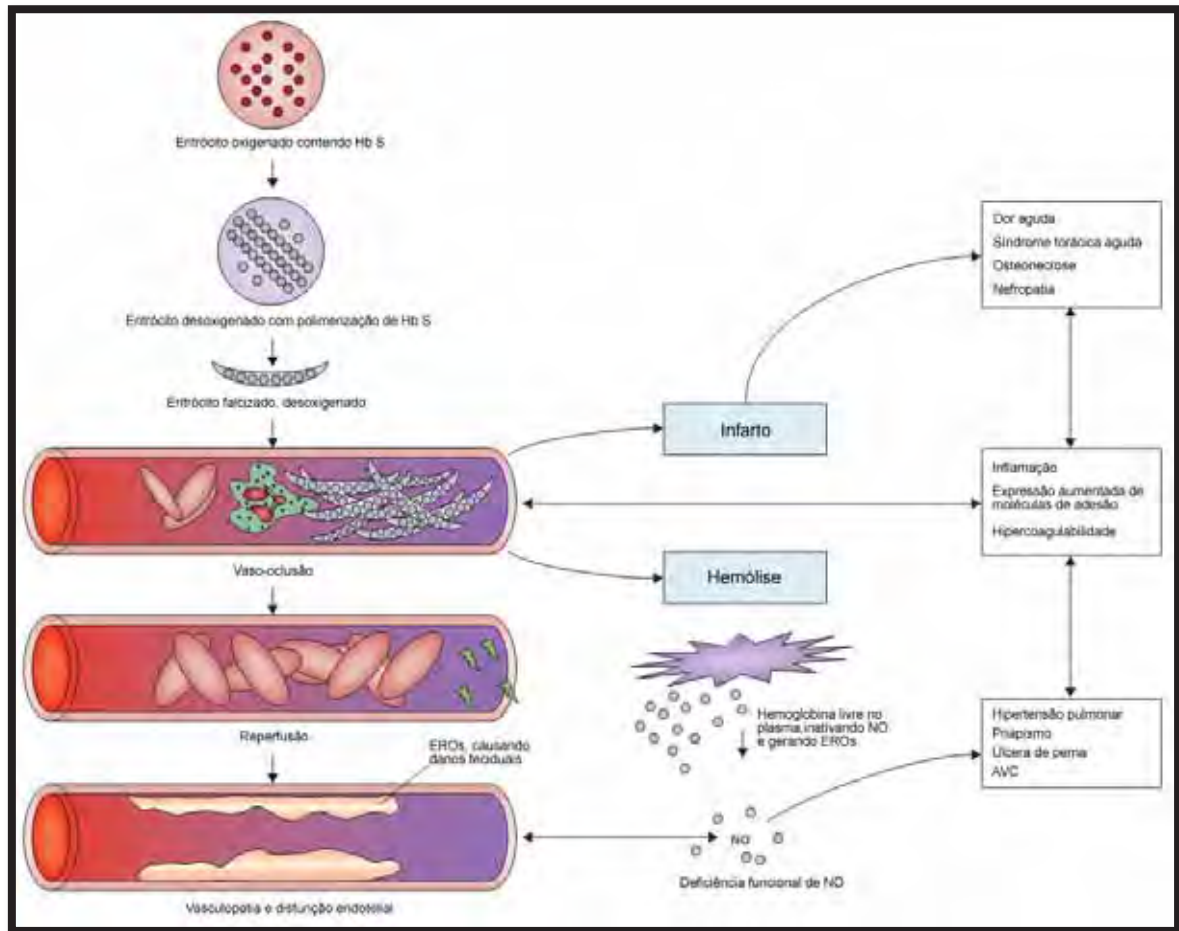


Figura 4. Representação esquemática da fisiopatologia da anemia falciforme. A desoxigenação da Hb S promove a polimerização dentro dos eritrócitos, levando à falcização das células. A interação dos eritrócitos falcizados com os leucócitos e o endotélio vascular resulta na vaso-oclusão, que leva ao infarto, hemólise e inflamação. A inflamação, por sua vez, aumenta a expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, a tendência de eritrócitos falcizados aderirem ao endotélio vascular e intensificar o processo vaso-oclusivo. A reperfusão dos tecidos isquêmicos gera radicais livres e danos oxidativos, e esses eritrócitos danificados liberam hemoglobina livre no plasma, o que contribui para o desenvolvimento de vasculopatias (modificado de REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

1.4 Complicações clínicas da anemia falciforme

As manifestações da doença são mediadas, principalmente, por dois processos fisiopatológicos, a vaso-oclusão e a anemia hemolítica. Crises vaso-oclusivas são causadas pelo aprisionamento de eritrócitos e leucócitos na microcirculação, causando obstrução vascular e isquemia tecidual, evento que tem início, geralmente, devido a processos inflamatórios. Assim como a vaso-oclusão, a hemólise também é impulsionada pela polimerização da Hb S, e pode contribuir para uma vasculopatia progressiva. Várias complicações estão associadas ao aumento da taxa de hemólise, como ulceração de perna, priapismo e hipertensão pulmonar (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A dor aguda é a principal causa de admissão hospitalar e, embora não resulte em danos permanentes a órgãos, é uma importante complicação doença, estando sua frequência associada à morte mais precoce dos pacientes. Episódios frequentes de dor são associados a níveis mais baixos de hematócrito e baixas concentrações de Hb F (PLATT et al., 1991 apud REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). A segunda maior causa de internação hospitalar em pacientes com AF é a síndrome torácica aguda (STA), caracterizada por infiltrado alveolar envolvendo pelo menos um dos segmentos dos pulmões, causando uma combinação de fatores como infecção, embolismo e vaso-oclusão pulmonar (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

O acidente vascular encefálico (AVE) corresponde a uma síndrome neurológica aguda secundária à oclusão de artéria ou hemorragia, que resulta em isquemia e sintomas e sinais neurológicos, no entanto, infartos silenciosos também são comuns na AF (BALLAS et al., 2010).

A constante e elevada excreção de bilirrubina nas anemias hemolíticas faz com que ocorra a formação frequente de cálculos biliares, levando à litíase biliar, com possível evolução para colecistite crônica calculosa, complicação bastante frequente na DF e, mais especialmente, na AF, o que geralmente requer procedimento cirúrgico – a colecistectomia (TRAINA; SAAD, 2007).

A ulceração de perna é uma complicação comum da DF, mas que ocorre principalmente em indivíduos com genótipo SS e tem início geralmente entre os 10 e 25 anos de idade. Obstrução mecânica por hemácias densas, insuficiência venosa, infecções bacterianas, vaso-constricção, anemia com diminuição da capacidade de transporte de

oxigênio e diminuição da biodisponibilidade de NO, levando à deficiência da função endotelial, são fatores que podem contribuir para a ocorrência de úlcera de perna nesses indivíduos. As úlceras são dolorosas, recorrentes e mais comuns em locais com pouco tecido subcutâneo, gordura fina e fluxo sanguíneo reduzido (MACK; KATO, 2006; MINNIT et al., 2010).

Complicações ósseas em doentes falciformes podem aparecer, geralmente, em decorrência da vaso-oclusão, e também devido a hemólise e infecção. No local do osso infartado, é comum a presença de dor, inchaço e eritema, além disso, pode haver febre, implicando na possibilidade de infecção, como uma complicação subjacente (BALLAS et al., 2010).

Sequestro esplênico agudo é uma das principais causas de morte em crianças com AF. Nesses pacientes, a prevalência de sequestro esplênico está entre 7% e 30%. Trata-se de uma complicação caracterizada pelo rápido crescimento do baço devido ao aprisionamento de hemácias falcizadas e outros componentes do sangue, podendo levar o paciente ao choque, devido à retenção de um grande volume de sangue circulante. A detecção da diminuição da concentração de hemoglobina em pelo menos 2 g/dL do nível basal do indivíduo, geralmente com evidências de reticulocitose (aumento da contagem de reticulócitos em cerca de 25%), é de grande importância para o reconhecimento imediato do sequestro esplênico e seu tratamento (BALLAS et al., 2010).

Complicações cardíacas também podem ocorrer em portadores da AF e são causadas, principalmente por disfunções diastólicas ou ainda por disfunções sistólicas. Quando isoladas, essas disfunções elevam o risco de morte para esses pacientes, porém, quando associadas a quadros de hipertensão pulmonar mostram forte influência na taxa de mortalidade desses indivíduos (GLADWIN et al., 2004; SACHDEV et al., 2007).

Hipertensão pulmonar é definida como o aumento da pressão sistólica da artéria pulmonar e representa uma complicação clínica comum na AF. Cerca de 20% da população apresenta média maior do que 35mmHg e 10% têm hipertensão pulmonar grave, com média maior que 45mmHg. Nesses pacientes, a hipertensão pulmonar pode representar um risco de morte elevado (GLADWIN, et al., 2004; KATO et al., 2009). Seus sintomas incluem fadiga e dispnéia em graus variados, e nos estágios mais avançados, podem ocorrer dor torácica, edema periférico e outros sinais de insuficiência cardíaca (CASTRO et al., 2007).

Lesões renais, geralmente caracterizadas por hiperfiltração glomerular e disfunção tubular, que ocorrem devido à polimerização da Hb S na medula renal, levam a um quadro de albuminúria e proteinúria (SCHEINMAN, 2009). Manifestações oculares também são importantes complicações e podem atingir vários segmentos do olho, incluindo conjuntiva, íris e fundo do olho, porém, seus sintomas são tardios (ELAGOUZ et al., 2010).

O priapismo é a ereção dolorosa, prolongada e involuntária do pênis, resultado de influxo arterial aumentado ou, mais comumente, baixo fluxo venoso, levando ao aprisionamento de sangue dentro do corpo erétil. Embora não seja comum na população, a manifestação é bastante frequente na DF (ELAND et al., 2001 apud NOLAN et al., 2005). Cerca de 30% dos homens com AF com até 20 anos de idade relatam a ocorrência de pelo menos um episódio de priapismo, enquanto frequências de 30% a 40% são estimadas para homens adultos. Dentre os indivíduos com priapismo, cerca de 75% têm sua primeira ocorrência antes dos 20 anos, com média de idade entre 12 e 15 anos (ADEYOJU et al., 2002; BRUNO et al., 2001 apud NOLAN et al., 2005).

1.5 Tratamento com hidroxiureia na anemia falciforme

Pacientes com DF, principalmente os homozigotos para a Hb S, apresentam quadro clínico grave desde a infância (HOPPE et al., 2000) e o tratamento é baseado em três abordagens terapêuticas: transfusão sanguínea, uso de analgésicos e terapia a base de hidroxiureia (HU) (REES, 2011). A hidroxiureia, um derivado do ácido hidroxâmico, é um medicamento de administração oral, cujo principal efeito no tratamento de pacientes com AF é o aumento na síntese de Hb F, envolvida na redução da frequência de episódios vaso-occlusivos, crises de dor, transfusões e hospitalizações (LANZKRON et al., 2008; LIU et al., 2010). Por ser de fácil administração, baixa toxicidade, baixo custo e ter múltiplos efeitos, a HU tem ganhado espaço como terapia frequentemente adotada pelos clínicos, e sua experiência na AF vem sendo acumulada ao longo dos últimos 25 anos, sendo segura e bem tolerada pela maioria dos pacientes (WARE; AYGUN, 2009; KOVACIC, 2011).

Os mecanismos de atuação da HU ainda não são totalmente esclarecidos, mas sabe-se que ela é um agente citotóxico que atua na fase S do ciclo celular, interrompendo o ciclo pela inibição da atividade da ribonucleotídeo redutase e, dessa forma, reduzindo a síntese de DNA. Essa interrupção não específica do ciclo celular é, provavelmente, a principal responsável pela promoção da síntese de Hb F (Figura 5). Em cultura de células

demonstrou-se que doses de HU em células eritróides progenitoras podem aumentar a quantidade de hemoglobina intracelular total, mRNA de cadeias gama e os níveis de Hb F. Também há evidências de que a HU atue como um doador de NO, aumentando os níveis de cGMP (Guanosina Monofosfato cíclica), que acelera a tradução dos genes gama (COKIC et al., 2003; REES, 2011).

Estudos mostram que redução na gravidade das manifestações clínicas de pacientes tratados com HU ocorre concomitante à diminuição da contagem e da expressão de moléculas de adesão em leucócitos (KAUL; HEBBEL, 2000; FINNEGAN et al., 2007; LAURENCE et al., 2011). Os efeitos do uso de HU são dose-dependentes e, além do aumento nos níveis de Hb F, que pode chegar a cerca de 60% nos pacientes submetidos ao tratamento, também se observam aumento no volume do eritrócito e quantidade de hemoglobina em seu interior, redução na contagem de reticulócitos (COVAS et al., 2004; CHO et al., 2010), maior hidratação dos eritrócitos e diminuição da adesão celular ao endotélio (WILES; HOWARD, 2009; KOVACIC, 2011).

Em estudo multicêntrico realizado em 1995, verificou-se que a terapia com HU em pacientes com DF resultou em redução de 44% nas crises de dor e de 45% com relação à síndrome torácica aguda, além de 30% de redução na necessidade de transfusão sanguínea. Quando iniciada durante a infância, a mortalidade pode ser reduzida em até 40% (CHARACHE et al., 1995). Dessa forma, visando a melhora dos parâmetros sobre DF no Brasil, a Portaria SAS/MS nº 55, de 29 de janeiro de 2010, dentre outras mudanças, incluiu o uso de HU em crianças a partir de três anos de idade no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Doença Falciforme (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

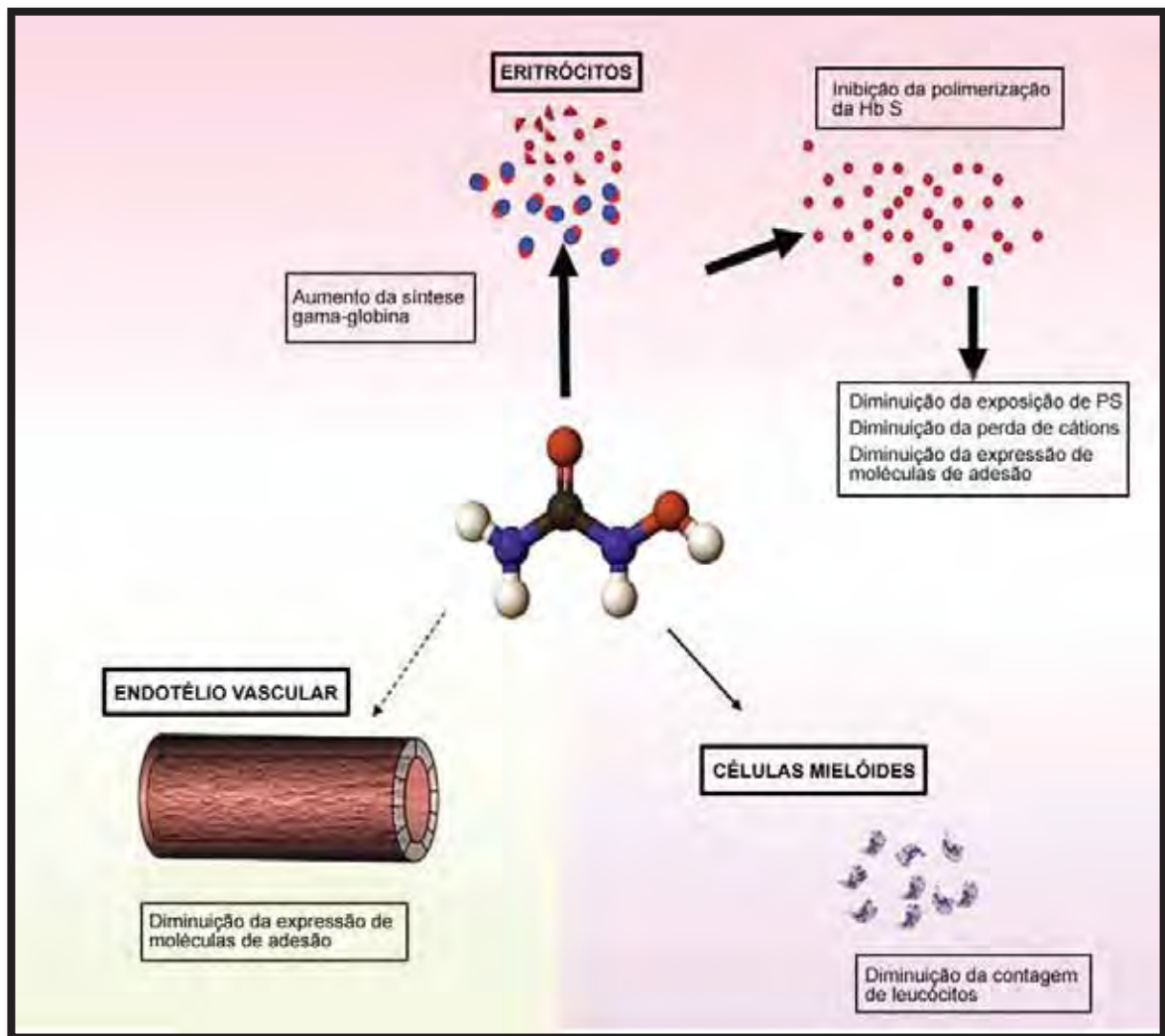


Figura 5. Três principais efeitos da hidroxiureia no organismo e seus benefícios na prevenção da vaso-oclusão e vasculopatias. A hidroxiureia pode agir diretamente na células eritróides, na contagem de neutrófilos e na expressão de moléculas de adesão (modificado de REES, 2011).

1.6 Aspectos genéticos na anemia falciforme

Evidências apontam a participação de vários genes na modulação do fenótipo da doença e, polimorfismos nesses genes candidatos, podem estar relacionados à diversidade de manifestações entre os indivíduos. A Hb F e os moduladores de sua expressão são grandes responsáveis pela variedade fenotípica da doença. Genes relacionados às vias da inflamação, biologia do NO, vaso-regulação, adesão celular e hemostasia também podem modular a DF, e SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) em alguns desses genes podem estar associados com os subfenótipos da DF (STEINBERG, ADEWOYE, 2006).

No caso dos genes com papel na modulação de respostas inflamatórias, em estudo de associação, Nolan e cols (2006) verificaram o envolvimento de polimorfismos no gene

TGFB (*transforming growth factor β*) no desenvolvimento de úlcera de perna em portadores da DF. Fertrin e Costa (2010), também baseados em estudos de associação, relataram o envolvimento da via do *TGF- β* em episódios de dor, ocorrência de infecção, infarto, úlcera de perna, priapismo, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar e falência renal. Em 2010, Cajado e cols mostraram que a presença do polimorfismo -308G/A no gene *TNFA* (*tumor necrosis factor α*) está associada à ocorrência de sequestro esplênico. Tavakkoli e cols (2004) verificaram aumento nos níveis de TNF- α em indivíduos com AF em uso de HU. Em camundongos falciformes transgênicos tratados com TNF- α , também se observou que maiores níveis dessa citocina aumenta a aderência de leucócitos às vênulas, resultando em vaso-oclusão (KAUL et al., 1995).

1.6.1 Gene *TNFA*

O TNF é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos e células T. É produzido como uma proteína de membrana, que é clivada em 17 formas solúveis, as quais desempenham papel nas atividades inflamatórias e imunomodulatórias, importantes para as defesas do organismo. Expressão aumentada de *TNF* está envolvida na patogênese de várias condições. Os níveis de TNF circulante são regulados em diferentes estágios: transcrição do gene, controle pós-transcricional da estabilidade do mRNA e expressão de receptores. Suas funções são mediadas pelos receptores de *TNF* (*TNFRs*), que influenciam a proliferação de células T e as respostas pró-inflamatórias (HAJEER; HUTCHINSON, 2001).

O *cluster* de genes *TNF* está localizado no cromossomo 6p21.3, dentro da região do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe III. Existem cinco microssatélites descritos (*TNFA-e*) e muitos SNPs dentro do *cluster*, incluindo o polimorfismo na região promotora -308G/A do *TNFA* (rs1800629), um dos mais estudados, devido ao considerável efeito da mutação na regulação do gene. A síntese de TNF- α é fortemente regulada em nível transcricional, e sua produção parece ter um componente genético de até 60%. Alguns estudos *in vitro* mostraram que a produção de TNF- α é maior em indivíduos GA (heterozigotos para a mutação -308G/A) do que em indivíduos GG (homozigotos normais para a mutação -308G/A), com o alelo A aumentando a transcrição do gene, porém, os resultados ainda são controversos, por exemplo, devido ao forte desequilíbrio de ligação nessa região (HAJEER; HUTCHINSON, 2001; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al. 2011).

A proteína TNF- α , descoberta em 1975, é uma molécula pró-inflamatória envolvida na ativação de leucócitos, neutrófilos e células endoteliais, estimulação de macrófagos, afinidade de receptores endoteliais, recrutamento e quimiotaxia de leucócitos, indução da cascata de coagulação e expressão de moléculas de adesão ao endotélio vascular (HEBBEL; MOHANDAS, 2001; ASSIS; CONRAN; CANALLI et al., 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI et al., 2007 apud CAJADO et al., 2011).

O TNF- α em excesso na circulação pode produzir efeitos deletérios sobre as células endoteliais por diminuir a disponibilidade de NO, tais como promoção da disfunção endotelial, danos celulares, apoptose e supressão das atividades das células endoteliais progenitoras que sustentam a reparação endotelial. TNF- α também promove danos celulares em decorrência do recrutamento de células de defesa, como neutrófilos, que podem mediar a destruição de tecidos (ZHANG et al., 2009; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2011). Tais características tornam os níveis de TNF- α um importante fator de risco na AF (HEBBEL; MOHANDAS, 2001; ASSIS; CONRAN; CANALLI et al., 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI et al., 2007 apud CAJADO et al., 2011). Pacientes com AF apresentam níveis elevados de TNF- α circulante, tanto em quadro estável quanto durante eventos de crise, o que possivelmente contribui para os eventos de oclusão vascular característicos da doença (LANARO; FRANCO-PENTEADO; ALBUQUEQUE et al., 2009 apud CAJADO et al., 2011).

Mudanças no balanço de citocinas em pacientes com AF são importantes fatores de risco para a ocorrência de eventos clínicos, e tais mudanças podem ser influenciadas pela presença do alelo A no polimorfismo -308G/A, aumentando o nível de transcritos de TNF- α (WILSON et al., 1997). Wilson e cols (1997) sugerem que diferenças na estrutura da cromatina no sítio polimórfico, em função do polimorfismo, poderiam favorecer a interação de fatores de transcrição, levando a maior ativação do gene *TNFA*.

1.6.2 Gene *TGFB*

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica que regula a proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares e participa de processos inflamatórios, angiogênese, reepitelização e regeneração tecidual (PASTAR et al. 2010). O TGF- β é considerada uma citocina principalmente pró-inflamatória, mas também desempenha papel crucial na angiogênese, juntamente com outros moduladores, como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

(CRIVELLATO, 2011). Em estudo com camundongos, por exemplo, deleções genéticas na via de sinalização do TGF- β levaram os animais à morte no útero devido a malformação dos vasos sanguíneos (DÜNKER; KRIEGLSTEIN, 2000).

O TGF- β é expresso principalmente por linfócitos *T helper*, macrófagos e fibroblastos (REDINGTON, 1998 apud SILVERMAN et al., 2004). É derivado da família gênica *TGFB*: *TGFB1*, *TGFB2* e *TGFB3*, que está localizada no cromossomo 19q13.1-13.3 e codifica três isoformas da citocina: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (WATANABE et al., 2002). A maioria do TGF- β presente na circulação corresponde à isoforma TGF- β 1 e, polimorfismos em seu gene correspondente, podem estar associados a várias complicações como infarto, osteonecrose, priapismo, úlcera de perna e hipertensão pulmonar em doentes falciformes (STEINBERG, 2009).

A produção de TGF- β 1 é controlada geneticamente e vários SNPs exercem influência nos níveis circulantes da citocina (BHAYAL et al., 2011). Em particular, o polimorfismo -509C/T (rs1800469), na região promotora do gene, altera o sítio de ligação consenso do fator de transcrição Ying Yang 1 (YY1) e está associado com altas concentrações circulantes de TGF- β 1 no plasma (GRAINGER et al., 1999). Silverman e cols (2004) mostraram que o alelo T aumenta a ligação do YY1, em cerca de 30%, e função basal do promotor, também em 30%. Grainger e cols (1999) relataram que a concentração de TGF- β 1 é aproximadamente duas vezes mais elevada em homozigotos TT do que em CC. Sie e cols (2006) também verificaram risco aumentado de infarto associado com a presença desse polimorfismo.

Considerando, então, que a AF é uma das alterações hematológicas hereditárias mais comuns, atinge uma parcela significativa da população mundial e acarreta ao portador respostas fenotípicas diversificadas (WHO, 2006), estudos que busquem elucidar os mecanismos de modulação dos eventos clínicos da doença se fazem de grande valia para permitir um tratamento individualizado aos pacientes. Como já demonstrado por vários estudos de associação, polimorfismos genéticos desempenham influência no perfil clínico dos pacientes, assim como na resposta destes à medicação. A maioria desses estudos, porém, faz apenas inferências sobre a participação de polimorfismos na expressão fenotípica da doença, logo, mais estudos confirmatórios são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos moduladores da AF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

2. Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Determinar a frequência dos polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFBI*) em portadores da AF e a possível relação com a ocorrência de episódios vaso-oclusivos e disfunção endotelial em pacientes com e sem o uso de HU.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar as frequências dos polimorfismos -509C/T e -308A/G dos genes *TGFBI* e *TNFA*, respectivamente, e comparar com as frequências relatadas na literatura;
- Avaliar a associação da presença ou ausência dos polimorfismos com a manifestação clínica da doença nesses pacientes.
- Avaliar o efeito da HU nas manifestações clínicas e se a resposta dos pacientes ao medicamento está associada à presença dos polimorfismos estudados.

3. Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Casuística

No ano de 2010, foram coletadas 588 amostras de sangue periférico de pacientes com DF em acompanhamento clínico no HEMORIO - Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcante, do Rio de Janeiro, RJ, após consentimento informado (Anexo I) e com aprovação do CEP HEMORIO 151/08, sob registro 151/08 (Anexo II). Aleatoriamente, foram separados 240 pacientes com AF, com genótipo comprovado por procedimentos laboratoriais clássicos e moleculares. Desses, 102 eram do gênero masculino (42,50%), com idades entre sete e 68 anos (média de $24,24 \pm 14,40$ anos) e 138 do gênero feminino (57,50%), com idades entre oito e 59 anos (média de $28,29 \pm 15,32$ anos).

Os dados hematológicos e as informações sobre medicação em uso, eventos clínicos e transfusões sanguíneas foram obtidos por meio da aplicação de questionário no momento da coleta e consulta aos prontuários médicos e ao banco de dados do HEMORIO, com acompanhamento dos clínicos responsáveis. A seguir, explicitamos as metodologias utilizadas para a execução desse trabalho.

3.2 Estudo das hemoglobinas

3.2.1 Preparação de hemolisados (NAOUM, 1990)

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e bioquímicos, as células foram lisadas para a obtenção da solução de hemoglobina utilizando-se duas metodologias: hemolisado rápido com saponina e solução de hemoglobina com clorofórmio.

Hemolisado Rápido com Saponina:

Princípio: É um procedimento realizado quando as amostras sanguíneas apresentam suspeita de hemoglobinas instáveis e talassemia do tipo alfa.

Reativo hemolisante:

- Saponina P.A. 1 g.
- Água destilada 100 mL.

Procedimento: Adicionou-se o volume de 100 μ L de sangue periférico ao volume de 100 μ L de reativo hemolisante em uma placa de *Kline*. Logo após, realizou-se a homogeneização até obtenção da hemólise total da mistura. Este hemolisado foi utilizado logo após o preparo.

Solução de Hemoglobina com Clorofórmio:

Princípio: É um método importante para dosagem de Hb F, Hb A₂ e meta-hemoglobina. O hemolisado obtido apresenta de 10 a 15 g/dL de hemoglobina.

Procedimento: Foi centrifugado 1 mL de sangue periférico colhido com anticoagulante EDTA, com solução salina a 0,85%, a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e os eritrócitos foram lavados, com solução salina, de duas a três vezes. Aos glóbulos vermelhos lavados, adicionou-se volume semelhante de água destilada. Após homogeneização, essa mistura recebeu um volume de clorofórmio igual ao volume da mistura, sendo centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos. O hemolisado foi transferido, por meio de pipeta Pasteur, para um tubo de ensaio com identificação da amostra.

3.2.2 Resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

Princípio: Esta técnica avalia a resistência dos eritrócitos à hemólise. Resultados positivos para este teste são encontrados em heterozigose para hemoglobina C e, principalmente, em casos de beta talassemia heterozigota, onde os eritrócitos microcíticos presentes são mais resistentes ao processo de hemólise.

Reagentes:

Solução Estoque NaCl a 10% pH 7,4:

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

Solução trabalho:

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

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

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

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

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Os resultados foram divulgados segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados:

- Alterações discretas (+).
- Alterações moderadas (++)
- Alterações acentuadas (+++).
- Células normais (N).

3.2.4 Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965)

Princípio: Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6:

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

Corante Ponceau:

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

Solução descorante:

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

Procedimento: Após estarem submersas em tampão TEB, durante 15 minutos, as fitas de acetato de celulose foram secas, com auxílio de papel absorvente. Depois de secas, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese e os compartimentos eletrolíticos foram conectados com auxílio de papel filtro. O hemolisado de Hb foi aplicado nas fitas de celulose com distância de 1,0 cm da extremidade da fita que estava em contato com o pólo negativo, recebendo 300 volts por 30 minutos. As frações globínicas formadas foram, primeiramente, observadas sem qualquer coloração sendo, depois, coradas com Ponceau. Para a coloração, as fitas foram submersas no corante durante 5 minutos e, posteriormente, embebidas em solução descorante por 30 minutos.

3.2.5 Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968)

Princípio: Técnica para diferenciar alguns tipos de Hb, que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino, e caracterização semi-quantitativa de Hb F.

Reagentes:

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

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

Gel de Ágar-Fosfato:

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

Procedimento: Misturou-se o ágar-fosfato e o tampão fosfato em um erlenmeyer de 250 mL até a completa dissolução do primeiro. A mistura foi levada ao microondas para que o gel pudesse ser formado. Pipetou-se 5,0 mL do gel em uma lâmina de microscópio, deixando-as gelificar à temperatura ambiente. Após a gelificação, as amostras foram aplicadas na porção média da lâmina. Utilizou-se papel filtro para promover a conexão entre o gel e os compartimentos eletrolíticos, passando 100 volts durante 30 minutos. As lâminas foram coradas, com o corante Ponceau, a fim de permitir melhor observação e interpretação das frações de Hb obtidas.

3.2.6 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (Instruction Manual Of Bio-Rad, 1999)

Princípio: O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. O equipamento consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna

detectando as alterações de absorvância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância *versus* tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento: Foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise em um tubo. Após hemólise total dos eritrócitos, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento. Os procedimentos foram realizados conforme a pré-programação de leitura das amostras.

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

3.3 Análise molecular

3.3.1 Extração de DNA (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989 – modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006)

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol.

Princípio: Este método promove a extração de DNA de sangue periférico utilizando-se fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na

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

Reagentes:

1. Solução de lise 1 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células vermelhas):
 - Sacarose 0,32 M 10,95g.
 - Tris HCl 10 mM 1mL.
 - MgCl₂ 5mM 0,5 mL.
 - Triton 1% 100x 1 mL.
 - Água ultrapura autoclavada 100 mL.

2. Solução de lise 2 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células brancas):
 - NaCl 0,075 M 2,19 g.
 - EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0) 20 mL.
 - Água ultrapura 500 mL.

3. Proteinase K (20 mg/mL):
 - Proteinase K 20 mg.
 - Água ultrapura 1 mL.

4. Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1:
 - Clorofórmio..... 24 mL.
 - Álcool isoamílico 1 mL.

5. SDS 10%:
 - SDS 10 g.
 - Água ultrapura 100 mL.

6. Etanol 70%

7. Fenol

8. KCl 2M:

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

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

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

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

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

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

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

3.3.2 Identificação da Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985)

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação, que envolvem o códon 6, foram:

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

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

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

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

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

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

Após a amplificação, o fragmento de 376 pb foi digerido a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

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

A mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição, assim, após a digestão, alelos normais geraram três fragmentos: 201 pb, 88 pb e 87 pb; enquanto alelos mutantes geraram dois fragmentos 288 pb e 88 pb.

A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizada sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

3.3.3 Identificação do polimorfismo -308G/A no gene *TNFA* por PCR-RFLP (WILSON et al., 1992 - com modificações)

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação foram:

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

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

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

| | |
|------------------------------------|----------|
| H ₂ O Mili Q | 5,0 µL. |
| <i>Primer TNFA1</i> 10 µM | 3,75 µL. |
| <i>Primer TNFA2</i> 10 µM | 3,75 µL. |
| dNTP 1,25 mM | 5,0 µL. |
| Tampão sem MgCl ₂ | 2,5 µL. |
| MgCl ₂ 50 mM | 2,5 µL. |
| Taq Polimerase 5U | 0,5 µL. |
| DNA 150 ng/µL | 2,0 µL. |

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições de ciclagem:

- Ativação a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 35 repetições
 - Desnaturação inicial durante 1 minuto e 30 segundos a 95°C.
 - Anelamento durante 1 minuto a 62°C.
 - Extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento gerado, de 117 pb, foi digerido a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

| | |
|-------------------------------------|---------|
| H ₂ O Mili Q | 8,5 µL. |
| Tampão | 1,0 µL. |
| Enzima <i>Nco</i> I (C↓CATGG) | 0,5 µL. |
| Produto da PCR | 5,0 µL. |

A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada em gel de poliacrilamida a 8% submetido à eletroforese sob corrente constante de 120 V por 70 minutos, e corado com nitrato de prata. Na presença do alelo G, foram originados dois fragmentos (97 pb e 20 pb), enquanto o alelo A não possui o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando, então, apenas um fragmento (117 pb). Indivíduos heterozigotos apresentaram os três fragmentos (117 pb, 97 pb e 20 pb) (Figura 6).

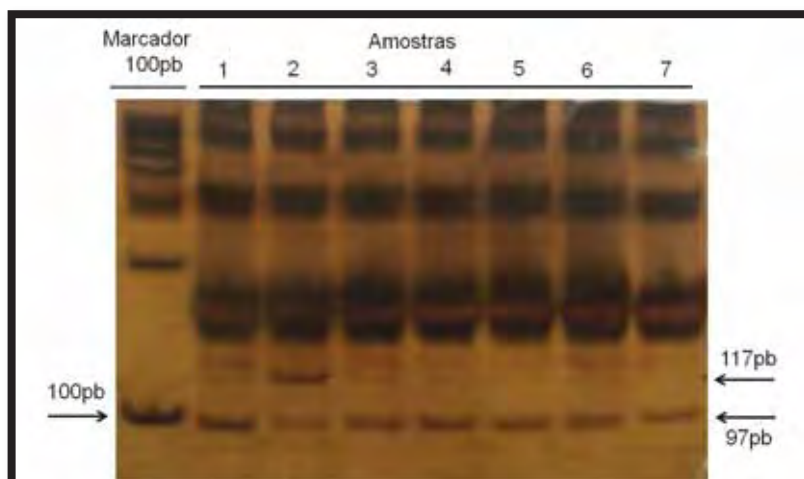


Figura 6. Gel de poliacrilamida para análise do polimorfismo -308G/A (TNFA). O fragmento gerado na amplificação tem 117pb. Na ausência do polimorfismo, a enzima de restrição gera dois fragmentos menores, 97pb e 20pb, este último não é visualizado no gel. Os resultados para as amostras da figura são: 1-GG, 2-GA, 3-GG, 4-GG, 5-GG, 6-GG, 7-GG.

3.3.4 Identificação do polimorfismo -509C/T no gene *TGFB* por PCR-RFLP (SILVERMAN et al., 2004)

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação foram:

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

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

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

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| H ₂ O Mili Q | 13,55 μ L. |
| <i>Primer TGFB1</i> 10 μ M | 2,0 μ L. |
| <i>Primer TGFB2</i> 10 μ M | 2,0 μ L. |
| dNTP 1,25 mM | 2,0 μ L. |
| Tampão sem MgCl ₂ | 2,5 μ L. |
| MgCl ₂ 50 mM | 0,75 μ L. |
| Taq Polimerase 5U | 0,2 μ L. |

DNA 150 ng/ μ L 2,0 μ L.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Ativação a 95°C por 5 minutos
- Ciclo de 35 repetições
 - Desnaturação inicial durante 30 segundos a 95°C.
 - Anelamento durante 30 segundos a 60°C.
 - Extensão de 30 segundos a 72°C.
- Extensão final durante 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 406 pb foi digerido a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

H₂O Mili Q 8,5 μ L.
Tampão 1,0 μ L.
Enzima *Bsu36* I (CC↓TNAGG) 0,5 μ L.
Produto da PCR 5,0 μ L.

Na presença do alelo C, foram originados dois fragmentos (223 pb e 183 pb), enquanto a presença do alelo T elimina o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando, então, apenas um fragmento (406 pb). Indivíduos heterozigotos apresentaram os três fragmentos (406 pb, 223 pb e 183 pb). Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 7).

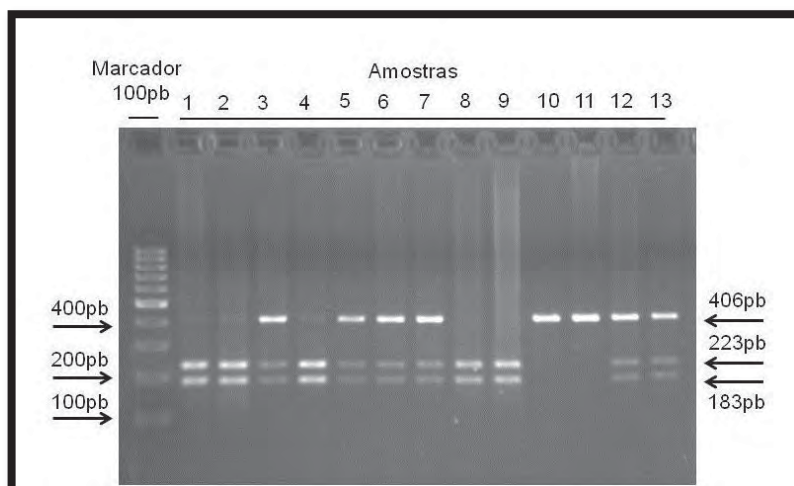


Figura 7. Gel de agarose para análise do polimorfismo -509C/T (*TGFB*). O fragmento gerado na amplificação tem 406pb. Na ausência do polimorfismo, a enzima de restrição gera 2 fragmentos (183pb e 223pb). Os resultados para as amostras da figura são: 1-CC, 2-CC, 3-CT, 4-CT, 5-CT, 6-CT, 7-CT, 8-CC, 9-CC, 10-TT, 11-TT, 12-CT, 13-CT.

3.4 Análises estatísticas

As informações sobre o perfil hematológico dos pacientes foram avaliadas quanto à sua normalidade e a homoscedasticidade pelos *testes de Shapiro-Wilk* e *teste de Levene*, respectivamente. Para os dados que atenderam as premissas para a utilização de testes paramétricos foi empregada a *teste t-student* e, para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Tanto para a comparação das frequências do presente estudo com informações da literatura, quanto para a avaliação da influência do uso da HU nos eventos clínicos, foi adotado o teste de qui-quadrado. A associação dos polimorfismos em estudo com as manifestações clínicas foi avaliada pelo teste de *Odds Ratio*. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software *Statistica 7.0*, e o nível de significância adotado foi de 95%.

4. Resultados

4 Resultados

4.1 Frequência dos polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFBI*)

Os polimorfismos nos genes *TNFA* e *TGFBI* foram avaliados em 240 pacientes do grupo de estudo. Para o polimorfismo -308G/A no gene *TNFA*, dois (0,83%) indivíduos tinham o alelo mutante em homozigose (AA), 43 (17,92%) foram heterozigotos para a mutação investigada (GA) e 195 (81,25%) apresentaram genótipo normal (GG). O polimorfismo -509C/T no gene *TGFBI* esteve presente em 15 (6,25%) indivíduos, em homozigose (TT), e em 116 (48,33%), em heterozigose (CT). Os restantes 109 (45,42%) pacientes apresentaram o genótipo normal (CC) (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFBI*) nos pacientes com anemia falciforme.

| Polimorfismo | Genótipo | Frequência genotípica | Frequência alélica |
|---------------------------|----------|-----------------------|----------------------|
| <i>TNFA</i> (-308G/A) | GG | 81,25% | G = 0,90 A = 0,10 |
| | GA | 17,92% | |
| | AA | 0,83% | |
| <i>TGFBI</i> (-509C/T) | CC | 45,42% | C = 0,70 T = 0,30 |
| | CT | 48,33% | |
| | TT | 6,25% | |

As Tabelas 2 e 3 trazem o levantamento das frequências alélicas encontradas para os polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFBI*), respectivamente, obtidas por outros autores e em banco de dados, assim como uma comparação com as frequências observadas neste estudo.

As frequências observadas para o polimorfismo -308G/A (*TNFA*) foram semelhantes às encontradas por outros estudos na população brasileira normal e com AF (CAJADO et al, 2011; VICARI et al., 2011), e também não diferiram da população normal indiana (GHOSH et al., 2010). Comparações estatísticas com os dados fornecidos pelo banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) não foram possíveis uma vez que o número amostral utilizado pelo banco é desconhecido, no entanto, pode-se notar que as frequências alélicas encontradas neste estudo foram semelhantes às da

população européia e, principalmente, da população africana (dbSNP, NCBI, 2012).

Para o polimorfismo -509C/T (*TGFBI*), as frequências não diferiram das encontradas para população de indivíduos normais da Hungria (ROVÓ et al., 2010) e de indivíduos com asma grave do Brasil (FARIA et al., 2008). Porém, apresentaram-se diferentes estatisticamente da população normal coreana (KIM et al., 2010). Da mesma forma que para o polimorfismo no gene *TNFA*, as comparações não foram possíveis com relação às frequências disponíveis no banco de dados utilizado, mas observa-se, também, que tentem a ser semelhantes às das populações de indivíduos caucasóides e africanos (dbSNP, NCBI, 2012).

Tabela 2. Frequências alélicas encontradas para o polimorfismo -308G/A (*TNFA*) em alguns estudos recentes e em banco de dados, em comparação com as frequências obtidas no presente estudo.

| Estudos | População | N | Frequência alélica | | p |
|----------------------|----------------------------|-----|--------------------|------|--------|
| | | | G | A | |
| Cajado e cols (2011) | População normal (Brasil) | 200 | 0,86 | 0,14 | 0,0951 |
| Cajado e cols (2011) | Anemia falciforme (Brasil) | 210 | 0,88 | 0,12 | 0,3923 |
| Vicari e cols (2011) | Anemia falciforme (Brasil) | 49 | 0,92 | 0,08 | 0,9748 |
| Ghosh e cols (2010) | População normal (Índia) | 216 | 0,94 | 0,06 | 0,0641 |
| dbSNP, NCBI (2012) | Europa | - | 0,83 | 0,17 | - |
| dbSNP, NCBI (2012) | Africa | - | 0,91 | 0,09 | - |
| Torres e cols (2012) | Anemia falciforme (Brasil) | 240 | 0,90 | 0,10 | - |

dbSNP,NCBI: data base SNP, National Center for Biotechnology Information.

Teste utilizado: Qui-quadrado; Nível de significância adotado: $p < 0,05$.

Tabela 3. Frequências alélicas encontradas para o polimorfismo -509C/T (*TGFBI*) em alguns estudos recentes e em banco de dados, em comparação com as frequências obtidas no presente estudo.

| Estudos | População | N | Frequência alélica | | p |
|----------------------|----------------------------|-----|--------------------|------|--------|
| | | | C | T | |
| Kim e cols (2010) | População normal (Coréia) | 352 | 0,52 | 0,48 | 0,0007 |
| Rovó e cols (2010) | População normal (Hungria) | 30 | 0,58 | 0,42 | 0,2593 |
| Faria e cols (2008) | Asma grave (Brasil) | 38 | 0,60 | 0,40 | 0,3378 |
| dbSNP, NCBI (2012) | Caucasóides | - | 0,70 | 0,30 | - |
| dbSNP, NCBI (2012) | Africanos | - | 0,80 | 0,20 | - |
| Torres e cols (2012) | Anemia falciforme (Brasil) | 240 | 0,70 | 0,30 | - |

dbSNP,NCBI: data base SNP, National Center for Biotechnology Information.

Teste utilizado: Qui-quadrado; Nível de significância adotado: $p < 0,05$.

4.2 Informações clínicas

Foram obtidas informações clínicas parciais de 118 pacientes, sendo 52 do gênero masculino (44,07%) e 66 do gênero feminino (55,93%), com idades entre sete e 63 anos e média equivalente a $30,85 \pm 13,50$ anos. As informações levantadas referem-se à ocorrência de AVE, retinopatia, cardiomegalia, STA, hipertensão pulmonar, litíase biliar, priapismo, proteinúria, úlcera de perna, necrose de fêmur e úmero e crises de dor (consideradas a partir de três eventos no último ano). Tendo em vista a importância das informações clínicas dos pacientes para este estudo, as análises, mostradas a partir de agora, foram realizadas tendo-se como base esses 118 indivíduos cujas manifestações da doença são conhecidas. A Figura 8 mostra a frequência de cada uma das manifestações relatadas para o grupo avaliado.

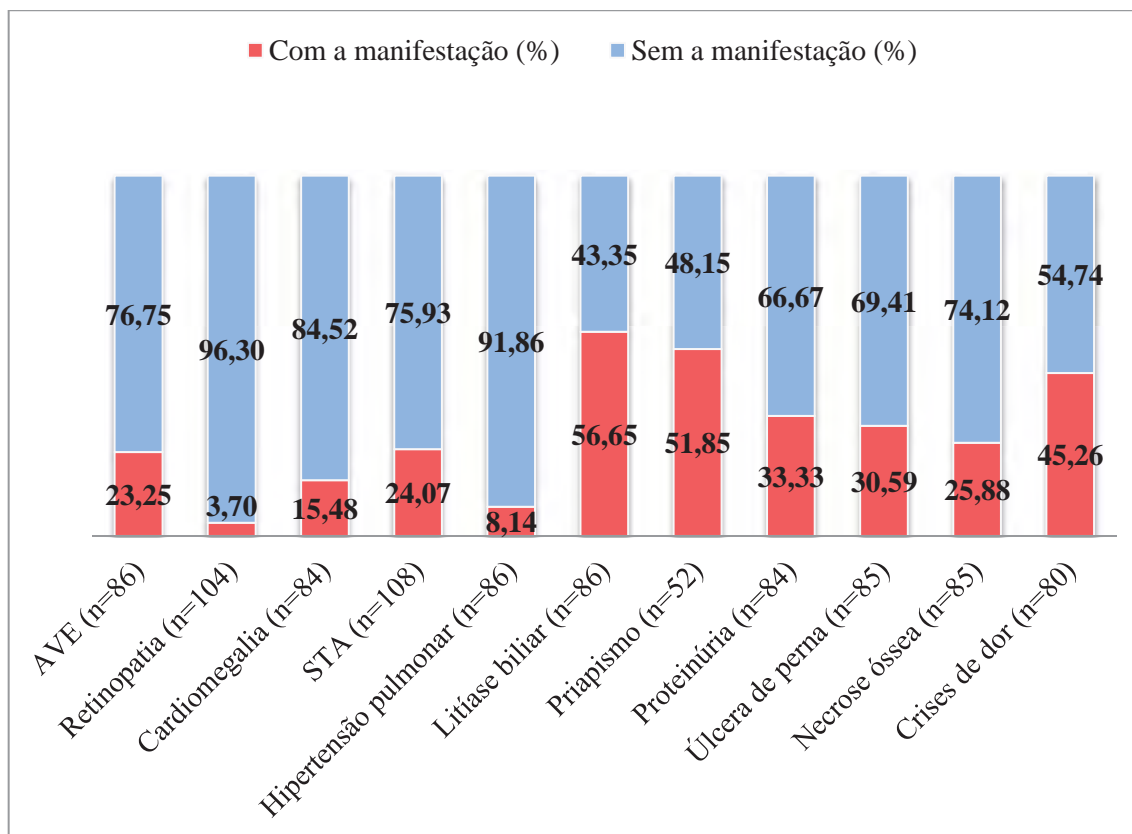


Figura 8. Frequência das manifestações clínicas no grupo de estudo. AVE: Acidente vascular encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda.

Os dados hemoglobínicos e hematológicos levantados compreendem: concentração de Hb F (%), contagem de glóbulos vermelhos (M/uL), concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (VCM) (fL), hemoglobina corpuscular média (HCM) (pg), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL) e contagem de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos, plaquetas e reticulócitos (K/uL) (Tabela 4). Quanto as avaliações enzimáticas, foram consideradas a dosagem de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (U/L) e a concentração de bilirrubina total, direta e indireta (BT, BD e BI) (mm/dL) (Tabela 5).

Os valores de Hb F, a contagem de reticulócitos e os níveis de LDH, AST e bilirrubinas estiveram aumentados nesses pacientes. Já a concentração de Hb e o hematócrito apresentaram-se diminuídos. Os demais parâmetros estavam dentro dos índices de normalidade, embora o VCM e a quantidade de plaquetas tenham ocorrido próximos aos valores de limite superior.

Tabela 4. Perfil hemoglobínico e hematológico dos 118 pacientes do grupo de estudo com informações clínicas relacionadas.

| Parâmetros | Média (\pmDP) | Valores de referência |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Hb F (%) | 10,06% \pm 7,03 | 0,0 - 1,0 |
| Eritrócitos (M/uL) | H: 2,77 \pm 0,61 | H: 4,5 - 5,9 |
| | M: 2,58 \pm 0,66 | M: 4,0 - 5,2 |
| Hemoglobina (g/dL) | H: 9,70 \pm 1,71 | H: 13,5 - 17,5 |
| | M: 8,59 \pm 1,33 | M: 12,0 - 16,0 |
| Hematócrito (%) | H: 28,05 \pm 5,16 | H: 41,0 - 53,0 |
| | M: 25,17 \pm 4,31 | M: 36,0 - 46,0 |
| VCM (fL) | 101,32 \pm 13,18 | 80,0 - 100,0 |
| HCM (pg) | 34,93 \pm 5,15 | 26,0 - 34,0 |
| CHCM (%) | 34,41 \pm 1,48 | 31,0 - 37,0 |
| Leucócitos (K/uL) | 9,79 \pm 3,40 | 5,0 - 10,0 |
| Neutrófilos (K/uL) | 5,22 \pm 2,34 | 1,8 - 5,0 |
| Linfócitos (K/uL) | 3,34 \pm 1,19 | 1,0 - 5,0 |
| Eosinófilos (K/uL) | 0,46 \pm 0,49 | 0,0 - 0,6 |
| Monócitos (K/uL) | 0,64 \pm 0,40 | 0,08 - 1,2 |
| Basófilos (K/uL) | 0,16 \pm 0,08 | 0,0 - 0,2 |
| Plaquetas (K/uL) | 399,16 \pm 160,10 | 140,0 - 400,0 |
| Reticulócitos (%) | H: 9,02 \pm 4,09 | H: 0,87 - 2,6 |
| | M: 9,02 \pm 4,03 | M: 1,06 - 2,63 |
| Reticulócitos (K/uL) | 227,75 \pm 106,83 | <150,0 |

DP: desvio padrão; H: homens; M: mulheres. M/uL: milhões por microlitro; g/dL: gramas por decilitro; fL: femtolitros; pg: picogramas; K/uL: mil por microlitros; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 5. Perfil enzimático dos 118 pacientes do grupo de estudo com informações clínicas relacionadas.

| Parâmetros | Média (\pmDP) | Valores de referência |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| LDH (U/L) | 859,92 \pm 434,13 | < 480,0 |
| AST (U/L) | H: 45,88 \pm 15,94 | H: < 35,0 |
| | M: 49,83 \pm 32,02 | M: <31,0 |
| ALT (U/L) | H: 30,94 \pm 12,87 | H: <41 |
| | M: 25,22 \pm 17,54 | M: < 31 |
| BT (mm/dL) | 3,34 \pm 2,05 | <1,2 |
| BD (mm/dL) | 0,78 \pm 0,78 | <0,2 |
| BI (mm/dL) | 2,56 \pm 1,77 | <0,7 |

DP: desvio padrão; H: homens; M: mulheres. U/L: unidades por litro; mm/dL: miligramas por decilitros. LDH: Lactato Desidrogenase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: Bilirrubina Total; BD: Bilirrubina Direta; BI: Bilirrubina Indireta.

4.3 Uso de hidroxiureia

Dos 118 indivíduos com informações clínicas parciais conhecidas, 70 estavam em uso de HU (59,32%). O tempo de exposição ao fármaco variou de um a nove anos, com média de quatro anos de uso. Com relação às manifestações clínicas, o uso de HU não mostrou influência na ocorrência das complicações avaliadas (Figura 9).

Quanto ao perfil hemoglobínico e hematológico, aparentemente o uso de HU mostrou tendência à normalização dos parâmetros avaliados, embora não tenha havido significância estatística entre os grupos (Tabela 6). Para os dados enzimáticos a mesma normalização foi observada, com os níveis de LDH diferindo estatisticamente em função do uso de HU (Tabela 7).

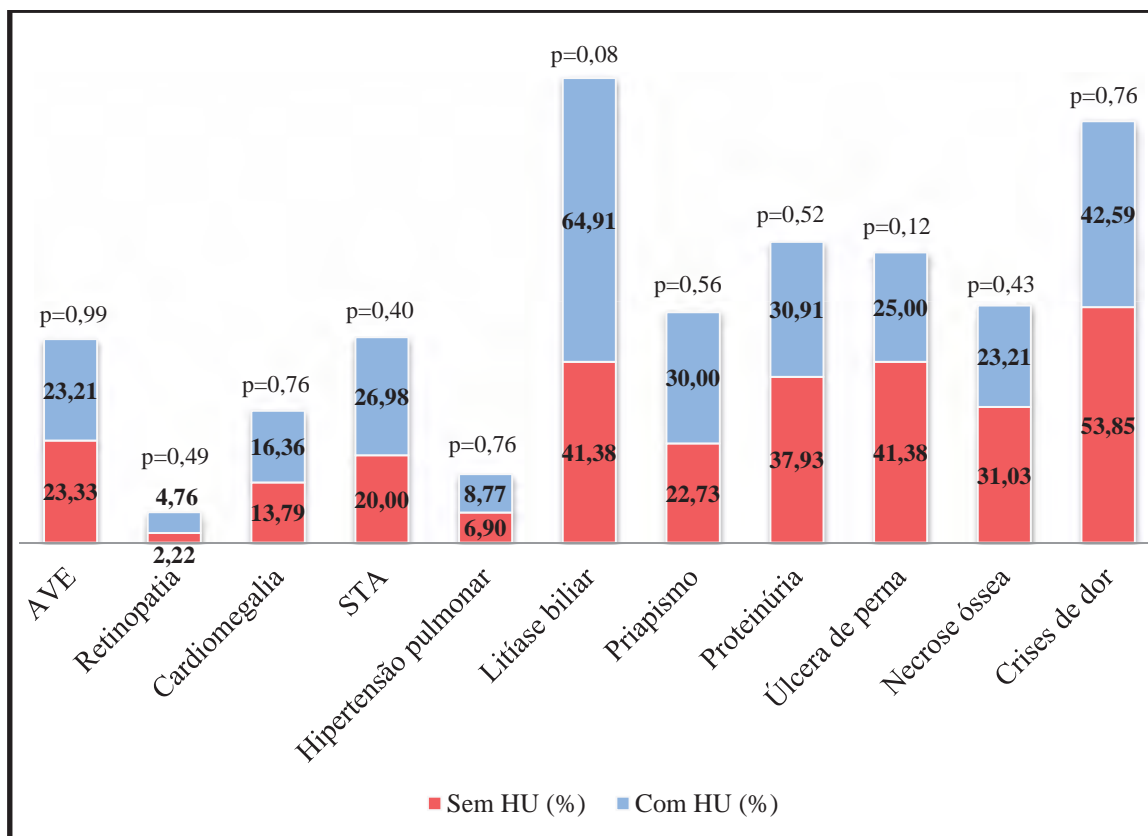


Figura 9. Relação entre o uso ou não de HU e a ocorrência das manifestações clínicas. AVE: Acidente vascular encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda; HU: Hidroxiureia. Teste utilizado: Qui-quadrado; Nível de significância estatística adotado: $p < 0,05$.

Tabela 6. Perfil hemoglobínico e hematológico dos pacientes com AF com e sem uso de HU.

| | Com HU | Sem HU | <i>p</i> | Valores de referência |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------------------|
| | Média (±DP) | Média (±DP) | | |
| Hb F (%) | 10,95 ± 7,09 | 8,70 ± 6,79 | 0,0930 | 0,0 - 1,0 |
| Eritrócitos (M/uL) | H: 2,87 ± 0,44 | H: 2,64 ± 0,80 | H: 0,5052 | H: 4,5 - 5,9 |
| | M: 2,63 ± 0,56 | M: 2,58 ± 0,66 | M: 0,3983 | M: 4,0 - 5,2 |
| Hemoglobina (g/dL) | H: 10,37 ± 1,34 | H: 8,88 ± 1,84 | H: 0,0975 | H: 13,5 - 17,5 |
| | M: 8,81 ± 1,43 | M: 8,59 ± 1,33 | M: 0,2324 | M: 12,0 - 16,0 |
| Hematócrito (%) | H: 29,25 ± 4,05 | H: 25,68 ± 5,66 | H: 0,0707 | H: 41,0 - 53,0 |
| | M: 25,92 ± 4,57 | M: 25,17 ± 4,31 | M: 0,1718 | M: 36,0 - 46,0 |
| VCM (fl) | 102,03 ± 11,71 | 100,11 ± 15,69 | 0,6490 | 80,0 - 100,0 |
| HCM (pg) | 35,06 ± 4,78 | 34,72 ± 1,76 | 0,7918 | 26,0 - 34,0 |
| CHCM (%) | 34,29 ± 1,31 | 34,61 ± 1,76 | 0,6554 | 31,0 - 37,0 |
| Leucócitos (K/uL) | 9,70 ± 3,52 | 9,93 ± 3,30 | 0,7989 | 5,0 - 10,0 |
| Neutrófilos (K/uL) | 5,24 ± 2,50 | 5,21 ± 2,15 | 0,9499 | 1,8 - 5,0 |
| Linfócitos (K/uL) | 3,28 ± 1,31 | 3,43 ± 0,96 | 0,7630 | 1,0 - 5,0 |
| Eosinófilos (K/uL) | 0,40 ± 0,40 | 0,55 ± 0,61 | 0,9100 | 0,0 - 0,6 |
| Monócitos (K/uL) | 0,63 ± 0,41 | 0,66 ± 0,41 | 0,9900 | 0,08 - 1,2 |
| Basófilos (K/uL) | 0,16 ± 0,08 | 0,16 ± 0,08 | --- | 0,0 - 0,2 |
| Plaquetas (K/uL) | 372,07 ± 157,26 | 448,88 ± 159,21 | 0,1482 | 140,0 - 400,0 |
| Reticulócitos (%) | H: 9,37 ± 5,11 | H: 8,57 ± 2,55 | H: 0,7633 | H: 0,87 - 2,6 |
| | M: 8,38 ± 3,64 | M: 10,47 ± 4,53 | M: 0,6701 | M: 1,06 - 2,63 |
| Reticulócitos (K/uL) | 231,27 ± 119,43 | 221,26 ± 82,65 | 0,7879 | <150,0 |

DP: desvio padrão; H: homens; M: mulheres. M/uL: milhões por microlitro; g/dL: gramas por decilitro; fl: femtolitros; pg: picogramas; K/uL: mil por microlitros; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Testes utilizados: teste t-student, para dados paramétricos, e Mann-Whitney, para dados não paramétricos. Nível de significância estatística adotado: $p < 0,05$.

Tabela 7. Perfil enzimático dos pacientes com AF com e sem uso de HU.

| | Com HU | Sem HU | <i>p</i> | Valores de referência |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| | Média (±DP) | Média (±DP) | | |
| LDH (U/L) | 715,13 ± 350,39 | 1108,14 ± 462,76 | 0,0300 | < 480,0 |
| AST (U/L) | H: 43,10 ± 16,08 M: 43,50 ± 20,59 | H: 50,50 ± 16,08 M: 64,29 ± 47,74 | H: 0,6094 M: 0,2850 | H: < 35,0 M: <31,0 |
| ALT (U/L) | H: 28,80 ± 14,47 M: 25,25 ± 17,14 | H: 34,50 ± 9,57 M: 25,14 ± 18,55 | H: 0,5857 M: 0,6885 | H: <41 M: < 31 |
| BT (mm/dL) | 2,90 ± 1,85 | 4,40 ± 2,31 | 0,2254 | <1,2 |
| BD (mm/dL) | 0,61 ± 0,31 | 1,20 ± 1,35 | 0,7160 | <0,2 |
| BI (mm/dL) | 2,29 ± 1,69 | 3,20 ± 1,97 | 0,3196 | <0,7 |

DP: desvio padrão; H: homens; M: mulheres. U/L: unidades por litro; mm/dL: miligramas por decilitros. LDH: Lactato Desidrogenase; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; BT: Bilirrubina Total; BD: Bilirrubina Direta; BI: Bilirrubina Indireta. Testes utilizados: teste t-student, para dados paramétricos, e Mann-Whitney, para dados não paramétricos. Nível de significância estatística adotado: $p < 0,05$.

4.4 Relação entre os polimorfismos e a clínica

Com o objetivo de verificar a associação entre os polimorfismos e as manifestações clínicas nos pacientes avaliados, os parâmetros foram comparados pelo teste estatístico de *odds ratio*.

A presença do polimorfismo -308G/A no gene *TNFA* mostrou possível influência no desenvolvimento de AVE, retinopatia, STA, hipertensão pulmonar e litíase biliar (OR > 1), porém, as tendências observadas, não foram estatisticamente significantes.

O polimorfismo -509C/T no gene *TGFBI* apresentou-se como possível fator de risco com relação a retinopatia, cardiomegalia, STA, hipertensão pulmonar, litíase biliar e crises de dor (OR > 1). Entretanto, significância estatística foi observada apenas com relação a presença do polimorfismo e a ocorrência de crises de dor (OR=2,8163; $p=0,0284$), e, em contrapartida, a ausência do polimorfismo e o desenvolvimento de necrose de fêmur e úmero (OR=0,3067; $p=0,0232$) (Tabela 8).

Um dos pacientes que relataram AVE teve recorrência do episódio quatro vezes e era portador do alelo T para o polimorfismo no *TGFBI*. Para a STA, dois indivíduos tiveram o evento duas vezes e também eram portadores do alelo T, um homozigoto (TT) e um heterozigoto (CT). Com relação a ocorrência de crises de dor, 14 pacientes apresentaram mais de seis eventos no último ano, seis deles eram heterozigotos para o

polimorfismo -509C/T e dois eram portadores do alelo A para o polimorfismo -308G/A, um em homozigose (AA) e outro em heterozigose (GA). Três a cinco eventos de dor foram encontrados em 23 pacientes, dos quais 17 apresentaram o polimorfismo -509C/T, sendo três homozigotos e 14 heterozigotos. Quatro deles eram heterozigotos para o polimorfismo -308G/A.

Tabela 8. Risco relativo de desenvolvimento das manifestações clínicas para os pacientes com anemia falciforme portadores dos polimorfismos -308G/A no gene *TNFA* e -509 no gene *TGFB1*.

| Complicação clínica | <i>TNFA</i> | | | <i>TGFB</i> | | |
|-------------------------|-------------|--------|----------------|-------------|---------------|----------------|
| | OR | p | IC 95% | OR | p | IC 95% |
| AVE | 1,3985 | 0,6137 | 0,3375-5,7950 | 0,8854 | 0,8122 | 0,3184-2,4623 |
| Retinopatia | 1,7033 | 0,6658 | 0,1487-19,5049 | 2,8840 | 0,3331 | 0,1919-43,3435 |
| Cardiomegalia | 0,8934 | 0,8918 | 0,1619-4,7183 | 1,0120 | 0,9828 | 0,2934-3,4895 |
| STA | 1,7484 | 0,3283 | 0,4031-7,5829 | 1,102 | 0,8152 | 0,4515-2,7299 |
| Hipertensão Pulmonar | 2,2306 | 0,3922 | 0,2468-20,1540 | 2,4372 | 0,2825 | 0,2826-21,0202 |
| Litíase biliar | 1,6110 | 0,4252 | 0,3088-8,4023 | 1,4210 | 0,4190 | 0,5522-3,6568 |
| Priapismo | 0,8181 | 0,8296 | 0,1114-6,0050 | 0,5000 | 0,3892 | 0,0334-7,4733 |
| Proteinúria | 0,7662 | 0,6756 | 0,1944-3,0191 | 0,8059 | 0,6428 | 0,3121-2,0813 |
| Úlcera | 0,8907 | 0,8571 | 0,2433-3,2612 | 0,8431 | 0,7185 | 0,3249-2,1876 |
| Necrose | 0,7452 | 0,6721 | 0,1643-3,3790 | 0,3067 | 0,0232 | 0,1097-0,8595 |
| Dor | 0,8468 | 0,9882 | 0,2645-2,7111 | 2,8163 | 0,0284 | 1,1977-6,6224 |

AVE: Acidente Vascular Encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda.

OR: *Odds Ratio* (equivale ao risco relativo de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do polimorfismo em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: polimorfismo associado positivamente com a manifestação; OR<1: polimorfismo associado negativamente com a manifestação; OR=1: polimorfismo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística adotado: p<0,05.

A distribuição das manifestações clínicas em função do genótipo e do uso ou não de HU encontram-se detalhadas nas Tabelas 9 e 10. Análises estatísticas não foram possíveis devido ao pequeno número amostral dentro de cada uma das subdivisões, mas cabe destacar a maior ocorrência de AVE em pacientes portadores do polimorfismo -308G/A (*TNFA*) sem uso de HU, em comparação com pacientes sem o polimorfismo e/ou sem o uso do fármaco. Relações semelhantes, porém em menor intensidade, foram em relação à ocorrência de necrose avascular e crises de dor. Para o polimorfismo -509C/T, há uma visível diminuição na frequência de necrose avascular em portadores do alelo mutante, que

é ainda mais acentuada quando há o uso de HU. O inverso observou-se para os episódios de dor, que se mostraram mais frequentes na presença do alelo T e na ausência da HU.

Tabela 9. Ocorrência das manifestações clínicas com relação ao genótipo para o polimorfismo -308G/A no gene *TNFA* e o uso de HU.

| Manifestação clínica | GG | | GA+AA | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| | Com HU (%) | Sem HU (%) | Com HU (%) | Sem HU (%) |
| AVE | 23,40 | 20,00 | 25,00 | 50,00 |
| Retinopatia | 5,78 | 0,00 | 0,00 | 14,28 |
| Cardiomegalia | 15,22 | 16,67 | 22,22 | 0,00 |
| STA | 25,00 | 18,42 | 36,36 | 28,57 |
| Hipertensão pulmonar | 6,25 | 8,33 | 22,22 | 0,00 |
| Litíase biliar | 62,50 | 33,33 | 55,55 | 80,00 |
| Priapismo | 54,54 | 50,50 | 50,00 | 0,00 |
| Proteinúria | 32,60 | 37,50 | 22,22 | 40,00 |
| Úlcera | 25,50 | 41,67 | 22,22 | 40,00 |
| Necrose | 25,53 | 29,17 | 11,11 | 28,57 |
| Crise de dor | 38,00 | 52,38 | 40,40 | 60,00 |

AVE: Acidente vascular encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda

Tabela 10. Ocorrência das manifestações clínicas com relação ao genótipo para o polimorfismo - 509C/T no gene *TGFBI* e o uso de HU.

| Manifestação | CC | | CT+TT | |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| | Com HU (%) | Sem HU (%) | Com HU (%) | Sem HU (%) |
| AVE | 28,00 | 18,75 | 19,35 | 28,57 |
| Retinopatia | 3,70 | 0,00 | 5,50 | 5,00 |
| Cardiomegalia | 16,67 | 13,33 | 16,13 | 14,28 |
| STA | 25,92 | 20,00 | 27,78 | 20,00 |
| Hipertensão pulmonar | 3,85 | 6,67 | 12,90 | 7,14 |
| Litíase biliar | 56,00 | 40,00 | 65,62 | 42,85 |
| Priapismo | 66,67 | 60,00 | 45,45 | 40,00 |
| Proteinúria | 33,33 | 40,00 | 29,03 | 35,71 |
| Úlcera | 32,00 | 33,33 | 19,35 | 50,00 |
| Necrose | 40,00 | 33,33 | 9,68 | 28,57 |
| Crise de dor | 30,43 | 50,00 | 50,00 | 64,28 |

AVE: Acidente vascular encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda

5. Discussão

5 Discussão

Vários estudos de associação genética têm sido realizados na tentativa de se estabelecer uma ligação entre a presença de determinados SNPs e complicações clínicas na DF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Neste trabalho, os achados com significância estatística referem-se ao polimorfismo -509C/T (*TGFB*) com relação ao desenvolvimento de episódios de dor e de necrose. Sendo o TGF- β uma citocina capaz de aumentar a adesão celular e recrutar moduladores inflamatórios para a circulação sanguínea (MASSAGUÉ, 1990), é esperado que os eventos vaso-oclusivos característicos da AF sejam acentuados na presença do polimorfismo avaliado, uma vez que o alelo T é responsável pelo aumento da produção da citocina (GRAINGER et al., 1999). Isso explicaria a maior ocorrência de crises de dor em indivíduos portadores do alelo T encontrada neste estudo.

No entanto, a presença do alelo T apresentou efeito benéfico em relação à ocorrência de necrose de fêmur e úmero. Dentre as inúmeras funções desempenhadas pelo TGF- β , destacam-se duas que poderiam justificar essa resposta: a estimulação da angiogênese e o controle da expressão de proteínas de matriz extracelular. A formação de novos vasos é um efeito já bem conhecido do TGF- β e bastante estudado em pacientes com câncer, no que diz respeito à progressão tumoral (MASSAGUÉ, 1990; GUAN et al., 2009). O aumento da vascularização e, conseqüentemente, da oxigenação tecidual dificultaria o aparecimento de necrose e úlcera em pacientes com AF e presença do polimorfismo, embora no presente trabalho só tenha sido observada diferença relacionada à necrose.

O TGF- β também é responsável pela expressão de proteínas de matriz, como fibronectina, colágeno, osteonectina e osteopontina, sendo as duas últimas glicoproteínas da matriz óssea responsáveis pela ligação ao cálcio e formação de ossos (MASSAGUÉ, 1990). Dessa forma, o aumento da expressão dessas proteínas, proporcionado pelo polimorfismo avaliado, poderia ser um fator protetor para necrose óssea, como observado neste trabalho. Não se pode, porém, pensar na angiogênese e na osteogênese como fatores isolados. A formação de novos vasos é essencial para a indução tecidual, morfogênese e formação de ossos, e o TGF- β tem participação tanto na indução osteogênica quanto na endocondral (RIPAMONTI, 2010).

Para as outras complicações clínicas relatadas nos pacientes avaliados, o polimorfismo -509C/T (*TGFBI*) não mostrou associação significativa. Sie e cols (2006) investigaram se alguns polimorfismos no gene *TGFBI*, incluindo o -509C/T, tinham

alguma relação com a ocorrência de AVE e não encontraram nenhum risco associado. Os efeitos do TGF- β em doenças ainda não estão bem estabelecidos e mostram-se controversos. Alguns pesquisadores, por exemplo, consideram que o seu efeito é, sobretudo, protetor, por reduzir os riscos de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (SALTIS; AGROTIS; BOBIK, 1996; ROBERTSON et al., 2003), enquanto outros, por outro lado, tratam essa citocina como uma indutora dessas mesmas complicações (SCHULICK et al., 1998).

Com relação ao polimorfismo -308G/A (*TNFA*) e as manifestações clínicas avaliadas, não foram encontradas associações. TNF- α é considerado uma citocina com efeitos pro-coagulantes no endotélio e sua participação na patogênese de várias doenças tem sido sugerida. Porém, os resultados obtidos por estudos que correlacionaram o efeito desse polimorfismo como sendo fator de risco para o desenvolvimento de algumas doenças são controversos. Vicari e cols (2011) também não encontraram associação entre o mesmo polimorfismo e a ocorrência de AVE em pacientes com AF da região sudeste do Brasil. Em 2004 e, posteriormente, em 2007, Hoppe e cols identificaram um papel protetor do alelo A na ocorrência de AVE em pacientes com AF dos Estados Unidos. Em contrapartida, Cajado e cols (2011) encontraram risco aumentado de 4,6 vezes na ocorrência de sequestro esplênico em pacientes com AF da região nordeste do Brasil que portavam o polimorfismo, em relação àqueles sem o alelo A.

Embora os dois polimorfismos avaliados neste estudo tenham potencial efeito nos processos vaso-oclusivos da AF, não se pode esperar que sejam os únicos ou os principais responsáveis pela expressão fenotípica encontrada nos pacientes com a doença. Nas manifestações clínicas em que não houve associação com os polimorfismos investigados, outros fatores genéticos podem estar atuando com maior ou menor intensidade e conferindo respostas diferentes nesses pacientes. Além de fatores genéticos, ainda, existem os fatores ambientais, que apesar de não serem bem definidos, poderiam dar origem a uma grande variedade de manifestações fenotípicas. Isso pode ser facilmente exemplificado pela maior gravidade da doença em indivíduos do continente africano, ou pela maior incidência de episódios de dor em épocas frias e chuvosas (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Todas as manifestações clínicas analisadas neste trabalho estiveram presentes nos pacientes avaliados, com maior ou menor intensidade, como esperado diante da diversidade fenotípica já bem descrita para essa doença. A associação do perfil clínico dos

pacientes com os polimorfismos e o uso de HU sugere que a medicação influencia na resposta fenotípica dos pacientes e pode atenuar o efeito dos polimorfismos na modulação das respostas clínicas avaliadas.

De acordo com o perfil de hemoglobinas, os níveis de Hb F estiveram aumentados nos pacientes do grupo de estudo. Sabe-se que em pacientes com AF, a concentração de Hb F varia de 1% a 30% e é herdada como um traço genético quantitativo. Três principais *loci* já identificados respondem por cerca de 50% de toda essa variação na AF: o polimorfismo *XmnI* na região promotora do gene da γ^G globina o *locus HMIP* no cromossomo 6q23.3 e o *BCL11A* no cromossomo 2 (GILMAN; HUISMAN, 1985; THEIN et al., 2007; MENZEL et al., 2007). No presente estudo, foi observada uma tendência de aumento dos níveis de Hb F em pacientes em uso de HU, o que reflete a capacidade da HU de regular a expressão de Hb F (GREEN; BARRAL, 2011).

O eritrograma, leucograma e dosagem enzimática dos pacientes mostraram-se alterados em função da doença. A contagem de eritrócitos e o hematócrito apresentaram-se reduzidos, devido à intensa hemólise característica da doença, assim como a quantidade de Hb. O VCM apesar de estar no limite superior da normalidade reflete a normocitose e macrocitose das hemácias dos indivíduos e a aderência ao uso de HU. A quantidade de reticulócitos está visivelmente aumentada e isso ocorre devido a grande necessidade de reposição de células que são retiradas de circulação. A hemólise foi refletida pelo aumento nos níveis de LDH, de bilirrubina e de reticulócitos, e o dano hepático foi visível devido aos altos valores de AST. O uso de HU com relação à hematologia dos pacientes mostrou tendência de normalização dos parâmetros, embora a diferença estatística esteja apenas no que diz respeito aos valores de LDH, mostrando a redução da hemólise proporcionada pelo fármaco.

As frequências encontradas para os polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFBI*), quando comparadas com as fornecidas por bancos de dados para populações caucásicas e africanas (dbSNP, NCBI, 2012), são semelhantes às do nosso estudo, refletindo a contribuição dessas populações para a composição étnica da população brasileira. Para o polimorfismo -308G/A (*TNFA*), as frequências semelhantes às obtidas em estudos com AF no Brasil (CAJADO et al., 2010; VICARI et al., 2011) mostram que os dados do presente trabalho estão consistentes com a literatura. Nossas frequências também não diferiram das encontradas para a população brasileira sem hemoglobinopatias (CAJADO et al., 2011), sugerindo que a herança do polimorfismo é independente da

herança da Hb S, e também não foram diferentes da população indiana (GHOSH et al., 2010), que também apresenta heterogeneidade em sua composição étnica.

Para o polimorfismo no gene -509C/T (*TGFBI*), as frequências encontradas não foram diferentes das encontradas em estudo no Brasil com pacientes com asma grave (FARIA et al., 2008). Como no estudo o polimorfismo não esteve associado ao risco no desenvolvimento de asma, a semelhança com as frequências obtidas em nosso estudo provavelmente deve-se ao fato de as duas populações serem similares. No presente estudo, também não houve diferença em relação a presença do polimorfismo e o desenvolvimento de STA e hipertensão pulmonar, podendo significar que o alelo mutante não está associado à complicações pulmonares. Com relação ao estudo realizado na Hungria com indivíduos normais (ROVÓ et al., 2010), uma população com características étnicas diferentes da população brasileira, a ausência de diferença entre as frequências pode ser devido ao pequeno número amostral (n=30) utilizado, que pode não ter sido suficientemente representativo da população húngara. As diferenças encontradas com relação à população coreana (KIM et al., 2010), por sua vez, evidenciam a pouca influência dessa etnia na formação da população brasileira.

Cabe ressaltar ainda que as semelhanças encontradas, especialmente com relação às frequências em populações africanas, refletem a história de colonização do Rio de Janeiro, local de origem dos pacientes avaliados neste estudo, mostrando a grande contribuição africana na formação dessa população.

6. Conclusão

6 Conclusão

As frequências alélicas encontradas no estudo para os polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFB*) estão de acordo com as frequências relatadas na literatura para grupos populacionais com etnias semelhantes às que compõem a população brasileira, e a herança dos polimorfismos avaliados parece não estar associada à presença da mutação que leva à origem da Hb S.

A presença do alelo T, do polimorfismo -509C/T (*TGFB*), apresenta um duplo efeito em pacientes com anemia falciforme, aumentando a chance de ocorrência de crises de dor e diminuindo a probabilidade de desenvolvimento de necrose óssea, devido às suas propriedades pró-inflamatórias e angiogênicas, respectivamente.

O uso de HU como tratamento para a AF melhora o quadro clínico dos pacientes e a associação do fármaco com a presença dos polimorfismos -308G/A (*TNFA*) e -509C/T (*TGFB*) pode influenciar nas manifestações clínicas da doença.

7. Referências

7 Referências

AKINSHEYE, I.; KLINGS, E.S. Sickle Cell Anemia and Vascular Dysfunction: The Nitric Oxide Connection. **Journal of Cellular Physiology**. v. 224, n. 3, p. 620-625, 2010.

BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. **Blood Reviews**. v. 25, n. 5, p. 205-213, 2011.

BALLAS, S. K. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v. 85, n. 1, p. 6-13, 2010.

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

BHAYAL, A. C. et al. Role of transforming growth factor- β 1 -509 C/T promoter polymorphism in gastric cancer in south Indian population. **Tumor Biology**. v. 32, n. 5, p. 1049-1053, 2011.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial**. 1993. 232 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 1993.

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

CAJADO, C. S. et al. IL-8 e TNF-alfa: marcadores imunológicos no prognóstico da anemia falciforme. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 80, n.3, p.56-61, 2010.

CAJADO, C. et al. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Citokine**. v. 56, n. 2, p. 312-317, 2011.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 3., p. 203-206, 2010.

CASTRO, L. M. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: Clinical and

laboratory endpoints and disease outcomes. **American Journal of Hematology**. v. 83, n. 1, p. 19-25, 2007.

CHARACHE, S. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **The New England Journal of Medicine**. v. 332, n. 20, p. 1317-1322, 1995.

CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sickle Cell Vaso-Occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.

CHO, C. S. et al. Hydroxyurea-Induced Expression of Glutathione Peroxidase 1 in Red Blood Cells of Individuals with Sickle Cell Anemia. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 13, n. 1, p. 1-11, 2010.

COKIC, V.P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**. v. 111, n. 2, p. 231-239, 2003.

COVAS, D. T. et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**. v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.

CRIVELLATO, E. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. **The International Journal of Developmental Biology**. v. 55, n. 4-5, p. 365-375, 2011.

DATA BASE SNP (dbSNP), Short Genetic Variation. National Center of Biology Information (NCBI). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em 25 jan. 2012.

DRISS, A. et al. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**. v. 2009, n. 2, p. 23-48, 2009.

DÜNKER, N.; KRIEGLSTEIN, K. Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. **European Journal of Biochemistry**. v. 267, n. 24, p. 6982-6988, 2000.

ELAGOUZ, M. et al. Sickle Cell Disease and the Eye: Old and New Concepts. **Survey of Ophthalmology**. v. 55, n. 4, p. 359-377.

FARIA et al. Association of TGF- β 1, CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. **Jornal de Pediatria**. v. 84, n. 3, p. 203-210, 2008.

FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**. v. 3, n. 4, p. 443–458, 2010.

FINNEGAN, E. M. et al. Adherent Leukocytes Capture Sickle Erythrocytes in an In Vitro Flow Model of Vaso-Occlusion. **American Journal of Hematology**. v. 82, n. 4, p. 266–275, 2007.

FRENETTE, P. S, ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation. Science in medicine**. v. 117, n. 4, p. 850-859, 2007.

GHOSH, L. et al. Investigation of TNFA 308G > A and TNFB 252G > A polymorphisms in genetic susceptibility to migraine. **Journal of Neurology**. v. 257, n. 6, p. 898-904, 2010.

GILMAN, J. G., HUISMAN, T. H. J. DNA sequence variation associated with elevated fetal G_γ globin production. **Blood**. v. 66, n. 4, p. 1463-1465, 1985.

GLADWIN, M. T. et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine** . v. 350, n. 9, p. 886-895, 2004.

GLADWIN, M. T., VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**. v. 359, n. 21, p. 2254–2265, 2008.

GUAN, X. et al. Polymorphisms of *TGFB1* and VEGF genes and survival of patients with gastric cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. v.28, p. 94, 2009.

GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type 1. **Human Molecular Genetics**. v. 8, n. 1, p. 93–97, 1999.

GREEN, N. S.; BARRAL, S. Genetic Modifiers of HbF and Response to Hydroxyurea in Sickle Cell Disease. **Pediatric Blood Cancer**. v. 56, n. 2, p.177-181, 2011.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of *TNF- α* Gene Polymorphisms on *TNF- α* Production and Disease. **Human Immunology**. v. 62, n. 11, p. 1191–1199, 2001.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human hemoglobin genetics**. Wien: Springer, 1986; 19-36p.

HOPPE, C. et al. Use of hydroxyurea in children aged 2 to 5 years with sickle cell disease. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**. v. 22, n. 4, p. 330-330, 2000.

HOPPE, C. et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**. v. 103, n. 6, p.2391-2396, 2004.

HOPPE, C. et al. Confirmation of an association between the TNF(308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**. v. 38, n. 8, p. 2241-2246, 2007.

HUISMAN, H. J. et al. HbVar: **A database of human hemoglobin variants and thalassemias. Summaries of mutation categories**. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 2001. Disponível em <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em fevereiro de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em <www.ibge.gov.br>. Acesso em fevereiro de 2012.

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

KATO, G. J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease : Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal of Hematology**. v. 84, n. 9, p. 618-625, 2009.

KAUL, D. K.; HEBBEL, R. P. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. **Journal of Clinical Investigation**. v. 106, p. 411-420, 2000.

KAUL, D. K., et al. In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling, and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. **Journal of Clinical Investigation**. v. 96, n. 6, p. 2845-2853, 1995.

KAUL, D. K.; FINNEGAN, E. M.; BARABINO, G. A. Sickle Red Cell-Endothelium Interactions. **Microcirculation**. v. 16, n. 1, p. 97-111, 2009.

KIM et al. Analysis of the transforming growth factor beta1 gene -509 C/T polymorphism in patients with advanced-stage endometriosis. **Fertil Steril**. v. 93, n. 7, p. 2121-2124, 2010.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 1, p. 24-31, 2011.

LANZKRON, M. D. S. et al. Systematic Review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine**. v. 148, n. 12, p. 939-955, 2008.

LAURENCE, S. et al. Differential modulation of adhesion molecule expression by hydroxycarbamide in human endothelial cells from the micro- and macrocirculation: potential implications in sickle cell disease vasoocclusive events. **Haematologica**. v. 96, n. 4, p. 534-542, 2011.

LIU, Y. H. et al. Antioxidant and amine oxidase inhibitory activities of hydroxyurea. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 74, n. 6, p. 1256-1260, 2010.

LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G.. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, 2007.

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 38, n. 8, p. 1237-1243, 2006.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of Human Fetal Hemoglobin. **IUMB Life**, v. 60, n. 2, p. 94-111, 2008.

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.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-*J* family. **Annual Review of Cell Biology**. v. 6, p. 597-641, 1990.

- MENZEL, S. et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. **Nature Genetics**. v. 39, n. 10, p. 1197-1199, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 55, de 29 de janeiro de 2010: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Doença Falciforme, 2010.
- MINNITI C. P. et al. Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v. 85, n. 10, p. 831-833, 2010.
- NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. 2 ed. São Paulo: Editora Santos, 1990.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006.
- NOLAN, V. G. et al. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. **Blood**. v. 106, n.9, p. 3264-3267, 2005.
- NOLAN, V. G. Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway: Sickle Cell Leg Ulcers, Genetics and Haemolysis. **British Journal of Haematology**. v. 133, n. 5, p. 570-578, 2006.
- NUSSBAUM, R. L. et al. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002; 162-167p.
- PASTAR, I. et al. Attenuation of the Transforming Growth Factor β -Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers. **Molecular Medicine**. v.16, n. 3-4, p. 92-101, 2010.
- REES, D. C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. **Haematologica**. v. 96, n. 4, p. 488-491, 2011.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.
- REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative biochemistry and Physiology**. Part C. v.146, n. 1-2, p.22-53, 2007.

RIPAMONTI, U. Soluble and insoluble signals sculpt osteogenesis in Angiogenesis. **World Journal of Biological Chemistry**. v. 1, n.5, p. 109-132, 2010.

ROBERTSON, A. K. et al. Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, n. 9, p. 1342-1350, 2003.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, L et al. *TNFA* -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**. v. 216, n.1, p. 125-130, 2011.

ROVÓ, L. The -509 C/T genotype of TGF- β 1 might contribute to the pathogenesis of benign airway stenosis. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**. v. 142, n. 3, p. 441-443, 2010.

SACHDEV, V., MACHADO, R. F., SHIZUKUDA, Y., et al. Diastolic dysfunction is an independent risk factor for death in patients with sickle cell disease. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 49, n. 4, p. 472-479, 2007.

SALTIS, J.; AGROTIS, A.; BOBIK A. Regulation and interactions of transforming growth factor- β with cardiovascular cells: implications for development and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 23, n. 3, p. 193-200, 1996.

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

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.

SCHEINMAN, J. I. Sickle cell disease and the kidney. **Nature Clinical Practice Nephrology**. v. 5, p. 78-88, 2009.

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

SCHULICK, A. H. Overexpression of transforming growth factor β 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. **Medical Sciences**. v. 95, n. 12, p. 6983-6988, 1998.

SIE, M. P. S. TGF- β 1 Polymorphisms and Risk of Myocardial Infarction and Stroke: The Rotterdam Study. **Stroke**. v. 37, n. 11, p. 2667-2671, 2006.

SILVERMAN, E. S. et al. Transforming growth factor- β 1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 169, n. 2, p. 623-627, 2004.

SILVESTRONI, E; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**. v. 27, n. 12, p. 198-212, 1975.

STEINBERG; ADEWOYE. Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol**. v. 13, n. 13, p. 131-136, 2006.

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

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

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

TAVAKKOLI, F. et al. Plasma levels of TNF-alpha in sickle cell patients receiving hydroxyurea. **Hematology**. v. 9, p. 61-64, 2004.

THEIN, S. L. et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 104, p. 1346-1351, 2007.

TRAINA, F.; SAAD, S. T. O. Complicações hepáticas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, 2007.

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

- VICARI et al. Absence of association between TNF- α polymorphism and cerebral large-vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. **Acta Haematologica**. v. 125, p. 141-144, 2011.
- WALKER, H. K. et al., **Clinical Methods**. Stoneham: Butterworth Publishers, 1990.
- WARE, R. E., AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology American Society of Hematology Education Program Book**. p. 62–9, 2009.
- WATANABE, Y. et al. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-1 (TGF-1) and its signaling pathway. **Journal of Human Genetics**. v. 47, p. 478-483, 2002.
- WHO. World Health Organization, 2006. Disponível em www.who.int/en. Acesso em fevereiro de 2012.
- WILES, N. M.; HOWARD, J. Role of hydroxycarbamide in prevention of complications in patients with sickle cell disease. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v. 5, p. 745-755, 2009.
- WILSON, A. G. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 7, p. 3195-3199, 1997.
- WILSON, A. G. et al. Single base polymorphisms in the human tumour necrosis factor α (TNF- α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Human Molecular Genetics**. v. 1, p. 353, 1992.
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.
- ZHANG, H., PARK, Y., WU, J. et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. **Clinical Science (Lond)**, v. 116, p. 219-230, 2009.

8. Anexos

8 Anexos

8.1 Anexo I



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE E DEFESA CIVIL

HEMORIO
INSTITUTO ESTADUAL DE HEMATOLOGIA
ARTHUR DE SIQUEIRA CAVALCANTI

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM COMPLICAÇÕES CLÍNICAS.

Pesquisadora Principal: Clarisse Lobo – Tel: 21 2332-8611 r: 2214

CEP HEMORIO: Thais Oliveira - Tel: 21 2224-1212

Você foi diagnosticado (a) com doença falciforme, um problema genético que afeta várias pessoas no mundo.

O médico que está envolvido nos seus cuidados está participando como investigador de um estudo que tem como objetivo principal avaliar os polimorfismos genéticos, ou seja, as variações que podem passar de pai para filho, em pessoas com doença falciforme, e a possibilidade de desenvolver Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP), ou seja, um aumento da pressão do sangue que circula do coração para o pulmão.

Sua autorização está sendo solicitada para que você participe do estudo. Esta autorização permitirá que o médico realize exames e coleta de dados médicos e exames laboratoriais de sangue por pesquisa de biologia molecular, isto é, tipo de pesquisa que estuda a estrutura e a função genética. A informação será registrada e analisada unicamente para a finalidade deste estudo. Sua identidade permanecerá em sigilo, e todas as informações médicas coletadas para o estudo serão analisadas em conjunto com os dados de outros pacientes.

A participação neste estudo não resultará em nenhuma mudança no seu tratamento. Porém, os resultados dos exames e das avaliações realizadas durante o estudo podem ajudar a guiar o médico e a equipe multidisciplinar quanto ao uso de novos medicamentos e tratamentos para o paciente com Doença Falciforme.

A participação no estudo pode não trazer benefício imediato ao paciente, mas é possível que outros pacientes no futuro beneficiem-se do conhecimento que será adquirido das informações coletadas para este estudo. Por outro lado, nenhum dano é esperado na participação deste estudo.

Caso você não aceite a participação neste estudo, não haverá mudança no seu tratamento ou da relação com o seu médico. Além disso, você pode mudar de ideia após ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido e, ao comunicar esta decisão ao médico, o paciente será excluído do estudo, sem nenhuma mudança no seu tratamento.

Ciente do exposto acima, eu autorizo o médico a incluir-me no estudo "ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM COMPLICAÇÕES CLÍNICAS" conforme indicado abaixo.

Eu concordo que o médico assistente e sua equipe tenham acesso aos meus dados e a informações específicas, desde que minha identidade seja mantida em sigilo.

Eu declaro que o propósito do estudo me foi explicado, que eu tive tempo suficiente para esclarecer dúvidas que eu tinha em relação ao estudo e que estou ciente de que eu posso sair do estudo a qualquer momento sem que haja comprometimento do meu tratamento.

Nome do paciente (letra de forma)

Assinatura do paciente ou representante legal

____/____/____
Data

Assinatura do Pesquisador

____/____/____
Data

8.2 Anexo II

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 aprobatório 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
