



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

Thaís Fernandes Ribeiro

**Perfil Leucocitário em Portadores de Hemoglobina S e de Mutações no
Gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*)**

São José do Rio Preto

2022

Thaís Fernandes Ribeiro

**Perfil Leucocitário em Portadores de Hemoglobina S e de Mutações no
Gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: PIBIC/RT – 2966/2021

CNPq – 100031/2022-6

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto

2022

R484p

Ribeiro, Thaís Fernandes.

Perfil leucocitário em portadores de hemoglobina S e de mutações no gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) / Thaís Fernandes Ribeiro. -- São José do Rio Preto, 2022

52 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado – Ciências Biológicas)
– Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Claudia Regina Bonini Domingos

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme. 3. Sobrecarga de Ferro. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Leucócitos. I. Título.

Thaís Fernandes Ribeiro

Perfil Leucocitário em Portadores de Hemoglobina S e de Mutações no Gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: PIBIC/RT – 2966/2021

CNPq – 100031/2022-6

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Regina Bonini Domingos

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Luciana de Souza Ondeí

UFG – Universidade Federal de Goiás

Prof^ª. Dr^ª. Fatima Adriana Mendes Siqueira

UNIP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

25 de janeiro de 2022

Dedico este trabalho a minha admirada família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço os meus pais Simone T. Fernandes Ribeiro e Ronei Ribeiro, meus exemplos de vida, que me apoiaram e me incentivaram a continuar os estudos. Sempre serei grata por tudo que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, Beatriz F. Ribeiro e Rafael F. Ribeiro, pelo carinho, amor, respeito e admiração.

Agradeço aos meus amigos Amanda K. Rivero, Beatriz Vilela, Lucas Toloí e Nikolas Alexander, pela compreensão, amizade e que não importa a distância, sempre estiveram ao meu lado.

À minha tia Fátima Fernandes, pelo carinho, amor e admiração.

Aos meus professores Jumara Ribeiro, Cinira Lima, Lia Barbosa, Deise Guerra, Alysson Guariento, Christiane Chasles e Maria do Carmo, que me serviram de inspiração e me incentivaram a cursar biologia. E ao Guilherme Dias Martins, pelo incentivo no ensino médio.

Aos meus amigos do laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) Ana Clara Albertin, Denny Malerba, Jonathan Rios, Lucas Ramos, por toda ajuda, paciência e ensinamentos, que contribuíram para a finalização deste trabalho.

À minha orientadora Claudia Regina Bonini Domingos, pela oportunidade de realizar este trabalho e por contribuir na minha formação profissional e pessoal. Agradeço pelos ensinamentos, confiança e paciência. Levarei comigo sempre essa admiração como pessoa e pesquisadora.

Agradeço à PIBIC/RT pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2966/2021, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp (PIBIC).

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 100031/2022-6, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Doença falciforme (DF) designa o conjunto de distúrbios hereditários que advém de mutações nos precursores eritróides com prevalência de hemoglobina S, caracterizada por mutação no gene beta globina. A hemoglobina S em homozigose (Hb SS) denomina a anemia falciforme (AF) e tem como consequência clínica anemia hemolítica crônica e sintomas variáveis. Para o tratamento é utilizado a hidroxiuréia (HU), única medicação com impacto na melhora da qualidade de vida dos pacientes. Devido à importância dos processos inflamatórios e dos fenômenos vaso-oclusivos, busca-se relacionar a doença falciforme com a hemocromatose hereditária a fim de identificar pacientes com maior risco de desenvolver quadros graves, pelo perfil de leucócitos (NLR). Tendo em vista que a hemocromatose hereditária está intimamente relacionada com os processos de homeostase do ferro celular e que pacientes com polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*) podem desenvolver uma série de doenças inflamatórias e neuronais, justifica-se a avaliação leucocitária em pessoas com anemia falciforme. Para tanto, foi necessário estabelecer a relação do genótipo de doença falciforme com o genótipo das mutações no gene *HFE* por meio de análise molecular indicando a possível gravidade clínica, mediante calculadora de gravidade da DF, e definir a expressão fenotípica da AF em pacientes em uso e sem uso de HU e a concentração de ferritina com o índice leucocitário. O estudo envolveu 516 pacientes, com idades entre 6 e 65 anos, provenientes do estado do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que para a anemia falciforme, nenhuma associação foi encontrada entre a heterozigose e homozigose para os polimorfismos do gene *HFE* e a análise de frequência exibiu o equilíbrio entre os alelos. Com relação à gravidade da doença, a mutação *H63D* apresentou diferença significativa e as mutações *C282Y* e *S65C* não; A baixa frequência em populações miscigenadas pode explicar o resultado. O gênero apresentou relação com o número de neutrófilos e linfócitos em uso ou não de HU. A associação do NLR com a ferritina demonstrou diferenças, indicando que casos graves de AF podem agravar a absorção de ferro. Já as variáveis gênero, presença ou ausência da mutação *H63D*, o uso ou não de hidroxiuréia e a gravidade da doença, não demonstraram diferenças. No entanto, as mutações no gene *HFE* podem influenciar no processo inflamatório da doença e o tratamento com HU diminui o NLR e contribui para uma diminuição do risco de morte, visto que o aumento do número de neutrófilos pode promover crises vaso-oclusivas. Este estudo enfatiza a importância do desenvolvimento de mais estudos sobre o efeito da HH na AF e sua relação com o NLR. Traçar o perfil dos portadores que estão predispostos a

desenvolverem quadros clínicos mais graves permite aos profissionais da saúde traçar estratégias para um suporte mais eficaz.

Palavras-chave: Doença falciforme, Hemocromatose hereditária, Anemia falciforme, Perfil de leucócitos.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) designates the set of hereditary disorders that result from mutations in erythroid precursors with prevalence of hemoglobin S, characterized by a mutation in the beta globin gene. Hemoglobin S in homozygosis (Hb SS) is called sickle cell anemia (SCA) and its clinical consequence of chronic hemolytic anemia and variable symptoms. For the treatment, hydroxyurea (HU) is used, the Only medication with impact on improving the quality of life of patients. Due to the importance of inflammatory processes and vaso-occlusive phenomena, an attempt is made to relate sickle cell disease with hereditary hemochromatosis in order to identify patients at higher risk of developing severe conditions, based on the leukocyte profile (NLR). Considering that hereditary hemochromatosis is closely related to cellular iron homeostasis processes and that patients with polymorphisms in the *HFE* gene (*C282Y*, *H63D* and *S65C*) can develop a series of inflammatory and neuronal diseases, leukocyte evaluation in people with sickle cell anemia is justified. Therefore, it was necessary to establish the relationship between the sickle cell disease genotype with the genotype of mutations in the *HFE* gene through molecular analysis indicating the possible clinical severity, using a SCD severity calculator, and to define the phenotypic expression of SCA in patients using and not using HU and the ferritin concentration with the leukocyte index. The study involved 516 patients, aged between 6 and 65 years, from the state of Rio de Janeiro. The results showed that for sickle cell anemia, no association was found between heterozygosity and homozygosity for the *HFE* gene polymorphisms and frequency analysis showed the balance between the alleles. Regarding disease severity, the *H63D* mutation showed a significant difference and the *C282Y* and *S65C* mutations did not; The low frequency in mixed populations may explain the result. Gender was related to the number of neutrophils and lymphocytes using or not HU. The association of the NLR with ferritin showed differences, indicating that severe cases of SCA can worsen iron absorption. While the variables gender, presence or absence of the *H63D* mutation, the use or not of hydroxyurea and severity of the disease did not show differences. However, mutations in the *HFE* gene can influence the inflammatory process of the disease and treatment with HU decreases the NLR and contributes to a decrease in the risk of death, since the increase in the number of neutrophils can promote vaso-occlusive crises. This study emphasizes the importance of developing more studies on the effect of HH on SCA and its relationship with the NLR. Tracing the profile of patients who are predisposed to

developing more severe clinical conditions allows health professionals to devise strategies for more effective support.

Keywords: Sickle cell disease, Hereditary hemochromatosis, Sickle cell anemia, Leukocyte profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para Hb S	26
Figura 2a – Esquema do produto de PCR (4961 pb)	29
Figura 2b – Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para a mutação <i>H63D</i>	29
Figura 3a – Esquema do produto de PCR (496 pb)	31
Figura 3b – Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para a mutação <i>S65C</i>	31
Figura 4a – Esquema do produto de PCR (441 pb)	34
Figura 4b – Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para a mutação <i>C282Y</i>	34
Figura 5 – Caracterização do genótipo de hemoglobina	37
Figura 6 – Total do genótipo de Hb SS nas mutações do gene <i>HFE</i>	38
Figura 7a – Frequência da gravidade da AF nos alelos da mutação <i>H63D</i>	40
Figura 7b – Frequência da gravidade da AF nos alelos da mutação <i>C282Y</i>	40
Figura 7c – Frequência da gravidade da AF nos alelos da mutação <i>S65C</i>	40
Figura 8 – Associação do NLR com variáveis	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de amplificação para PCR de Hb S	25
Tabela 2 – Protocolo de digestão para RFLP de Hb S	26
Tabela 3 – Protocolo de amplificação para PCR da mutação <i>H63D</i>	27
Tabela 4 – Protocolo de ciclos para PCR da mutação <i>H63D</i>	28
Tabela 5 – Protocolo de digestão para RFLP da mutação <i>H63D</i>	28
Tabela 6 – Protocolo de amplificação para PCR da mutação <i>S65C</i>	30
Tabela 7 – Protocolo de ciclos para PCR da mutação <i>S65C</i>	30
Tabela 8 – Protocolo de digestão para RFLP da mutação <i>S65C</i>	31
Tabela 9 – Protocolo de amplificação para PCR da mutação <i>C282Y</i>	32
Tabela 10 – Protocolo de ciclos para PCR da mutação <i>C282Y</i>	33
Tabela 11 – Protocolo de digestão para RFLP da mutação <i>C282Y</i>	33
Tabela 12 – Perfil das mutações no gene <i>HFE</i> no genótipo de hemoglobina	38
Tabela 13 – Frequência alélica do gene <i>HFE</i> no genótipo de hemoglobina	39
Tabela 14 – Número de neutrófilos e linfócitos em pacientes com AF em uso e sem uso de hidroxiuréia	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Doença Falciforme	14
1.2 Gene <i>HFE</i>	18
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Material	23
4.2 Métodos	24
4.2.1 Extração de DNA	24
4.2.2 Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP	25
4.2.3 Protocolo para detecção da mutação <i>H63D</i> no gene <i>HFE</i> PCR-RFLP	27
4.2.4 Protocolo para detecção da mutação <i>S65C</i> no gene <i>HFE</i> PCR-RFLP	29
4.2.5 Protocolo para detecção da mutação <i>C282Y</i> no gene <i>HFE</i> PCR-RFLP	32
4.2.6 Calculadora da gravidade da doença falciforme	34
4.2.7 Índice Leucocitário	35
4.2.8 Análise Estatística	35
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	47
8. REFERÊNCIAS	48
ANEXO A – RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSO	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença falciforme

A hemoglobina (Hb) é um heterotetrâmero presente no interior dos eritrócitos, formada por quatro subunidades do tipo alfa e beta, cada uma composta pela globina, fração proteica que varia geneticamente, e pelo heme, grupo prostético que contém o ferro, o qual se combina com o oxigênio e confere à molécula sua capacidade de transporte de gases (ZAMARO, BONINI-DOMINGOS, 2010). As cadeias alfa e beta são sintetizadas por genes localizados nos cromossomos 16 e 11, respectivamente. Cada cadeia do tipo alfa apresenta 141 aminoácidos e cada cadeia do tipo beta possui 146 aminoácidos (MOUSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2008).

A síntese de hemoglobinas possui um complexo sistema de regulação no processo de ontogênese, onde ocorrem alterações na expressão dos genes das globinas, o que permite a formação de diferentes tipos de Hb. Essas hemoglobinas possuem a mesma estrutura, diferenciando-se apenas pelos pares de cadeias globínicas. No período embrionário, são formadas as Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$), ainda nessa fase inicia-se a síntese de Hb Fetal (Hb F), constituída por duas cadeias alfa e duas gama ($\alpha_2\gamma_2$). A Hb F substitui gradativamente as hemoglobinas embrionárias, permanecendo até o nascimento em razão de sua maior afinidade com o oxigênio. Após o nascimento, a Hb F é substituída pelas Hb do adulto, com síntese de Hb A ($\alpha_2\beta_2$) e de Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$). Dessa forma, a hemoglobina predominante no adulto é a Hb A (96% a 98%), seguida pela Hb A₂ (2,5% a 3,5%) (GRILO, 2021; ZAMARO, BONINI-DOMINGOS, 2010).

Mutações no gene da globina ocasionam diferenças na síntese das cadeias alfa e beta, modificando o produto das subunidades de proteínas, como ocorre nas talassemias, ou produzem proteínas estruturalmente diferentes, sendo caracterizadas como hemoglobinas variantes. No segundo caso, essas mutações originam, geralmente, substituições de um único aminoácido na proteína globina, tendo como resultado a formação de um tetrâmero de hemoglobina variante (THOM *et al.*, 2013).

Dentre as diversas variantes de hemoglobinas descritas, está a Hemoglobina S (Hb S). Sua formação é consequência de uma mutação *missense* no DNA, cujo produto, um resíduo de ácido glutâmico, é substituído por uma valina na posição seis da cadeia beta-globina. A presença predominante de Hb S, indica a doença falciforme, havendo casos em que a Hb S

interage com outros tipos de hemoglobinas variantes, como por exemplo, com a Hb D, Hb C, e também com talassemias (ARDUINI; RODRIGUES; TROVÓ DE MARQUI, 2017).

A doença falciforme é uma das alterações hereditárias mais comuns na humanidade e acomete pessoas com ancestralidade indiana, árabe e principalmente africana, na qual a frequência do gene para Hb S atinge 1 a cada 3 ou 4 pessoas provenientes do oeste da África, enquanto no continente americano 1 a cada 400 afro-americanos possuem o gene. Nos países desenvolvidos a incidência do gene para Hb S é muito menor, mas o número de casos de doença falciforme vem aumentando devido à migração de pessoas dos países com alta frequência do gene (INUSA *et al.*, 2019).

Indivíduos com a Hb S em heterozigose (Hb AS), sendo o gene *HBBA* não mutado, podem usufruir de uma vida normal, pois não apresentam manifestações clínicas, exceto em casos atípicos, entretanto, quando há ocorrência do gene para Hb S (*HBBS*) em homozigose (Hb SS), os indivíduos apresentam a condição grave da doença, denominada anemia falciforme, principalmente decorrente da polimerização da Hb S, fazendo com que os eritrócitos adquiram forma de foice (SOARES *et al.*, 2017).

A estrutura espacial modificada da molécula é resultado da baixa concentração de oxigênio sanguíneo, acidose e desidratação, que promovem a formação de pontes de hidrogênio anormais entre os aminoácidos da valina na posição 1 com a valina mutante que substitui o ácido glutâmico na posição 6 da mesma cadeia polipeptídica. Isso propicia fenômenos de degradação oxidativa, com geração de radicais livres oxidantes (MOUSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2008). Como consequência da polimerização, os eritrócitos se tornam mais rígidos e densos, assim, nessas condições, eles são levados a sofrer hemólise e seu tempo de vida decai de aproximadamente 120 dias, no caso de eritrócitos sem alterações, para cerca de 10 a 20 dias (INUSA *et al.*, 2019).

O quadro clínico para indivíduos com anemia falciforme (Hb SS) é variável, e suas complicações podem ser separadas em três conjuntos. O primeiro, contém sintomas de anemia hemolítica e suas sequelas, que são complicações agudas da anemia falciforme, como hiper hemólise, caracterizada pela queda acentuada de hemoglobina seguida do aumento da taxa hemolítica; sequestro esplênico agudo, no qual ocorre sensibilização do baço consequente dos eritrócitos em forma de foice, e a concentração de hemoglobina decai para 2g/dL, sendo uma das principais causas de morte entre crianças; e crises aplásticas, nesse caso a eritropoiese é

interrompida por processos infecciosos o que ocasiona a redução da contagem absoluta de reticulócitos (BALLAS *et al.*, 2010).

O segundo conjunto de complicações é resultado do processo primário da doença e se relaciona a crises de dor aguda, subaguda, crônica ou episódicas dependendo do local em que houve dano tecidual. Dentre elas estão os episódios vaso-oclusivos, quando ocorre a obstrução do fluxo sanguíneo devido a forma de foice dos eritrócitos, ocasionando fortes crises de dor por horas ou, até mesmo, dias; há também crises de dor relacionadas a insuficiência multiorgânica aguda, síndromes de dor iatrogênicas e dores neuropáticas (BALLAS *et al.*, 2010).

O terceiro e último conjunto se relaciona aos principais órgãos, levando a complicações neurológicas, como o acidente vascular cerebral e o ataque isquêmico transitório; complicações oftalmológicas, cardíacas, pulmonares, gastrointestinais e renais (BALLAS *et al.*, 2010). Aliado a esses agravamentos, o processo inflamatório sistêmico e, em especial o envolvimento de plaquetas e de mediadores inflamatórios como gatilho para a vaso-oclusão, é ponto de estudo para entendimento dos mecanismos de ação moleculares e celulares na inflamação crônica da anemia falciforme (BALLAS; DARBARI, 2020).

A doença se manifesta de forma complexa com interações entre fatores modificadores, genes e meio ambiente. Sendo assim, a polimerização de hemácias falciformes, quando em ambientes desoxigenados, pode ser influenciada pela co-herança da talassemia alfa e nível de hemoglobina fetal (THEIN, 2017). Por se tratar de uma doença pleiotrópica sistêmica, a doença falciforme pode afetar quase todos os órgãos dos pacientes, suas manifestações fenotípicas variam em frequência e gravidade entre pacientes e no mesmo paciente ao longo do tempo (BALLAS *et al.*, 2010).

Esses sintomas podem levar os pacientes a óbito quando jovens, adultos ou até mesmo no início da infância. A fim de diminuir os agravamentos dos sintomas, o diagnóstico precoce se faz fundamental. Em razão da variedade de sintomas, o tratamento se baseia em medidas profiláticas, como uma alimentação rica em ácido fólico e zinco, hidratação, imunização com vacinas e terapia transfusional quando em casos de crises persistentes e uso de hidroxiuréia, a única droga que tem apresentado resultados no tratamento da doença (SOUZA *et al.*, 2016).

A hidroxiuréia é um quimioterápico que age sobre a eritropoiese, interrompendo a divisão celular e estimulando a síntese intraeritrocitária da Hb Fetal, para compensar os níveis baixos de oxigênio. Além disso, promove diminuição do número dos neutrófilos, hidratação eritrocitária e redução da expressão de moléculas de adesão dos eritrócitos, contribuindo para a

redução do número de crises vaso-oclusivas, do número de hospitalização e do tempo de internação, com impacto positivo na qualidade de sobrevivência dos pacientes com DF (CANÇADO *et al.*, 2009).

Com relação a gravidade da doença, foi desenvolvida uma ferramenta em 2007, denominada “Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme”, com a finalidade de definir escores de gravidade e classificação dos pacientes em categorias por fenótipo (leve, intermediária e grave). Essa ferramenta foi desenvolvida por meio de modelagem de rede Bayesiana usando 25 variáveis clínicas e laboratoriais para estimar um *score* de gravidade da DF, que varia de 0 (menos grave) a 1 (mais grave), com um modelo de rede calculando o risco de morte dentro de cinco anos. O valor preditivo, ou seja, a precisão da previsão de morte com base em um perfil clínico e laboratorial, do modelo foi validado em dois conjuntos independentes de pacientes e mostrou alta especificidade e sensibilidade (SEBASTIANI *et al.*, 2007). Essa ferramenta *on line* teve seus dados validados para a população brasileira por Belini Junior. O estudo dividiu 500 pacientes de acordo com a idade em três grupos, de 5 a 17 anos, de 18 a 40 anos, e acima de 40 anos. Em seguida, foram comparados os resultados pré e pós uso de hidroxiuréia, e estes resultados indicaram que os grupos brasileiros apresentam maior *score* de gravidade em relação aos grupos de outros países (BELINI JUNIOR *et al.*, 2015).

1.2 Gene *HFE*

O gene *HFE*, responsável pela codificação da glicoproteína de transmembrana denominada proteína HFE, colabora na regulação do metabolismo do ferro, sendo um cofator importante para diversos processos fisiológicos e biológicos, devido a sua capacidade de fazer ligações com receptores de transferrina, posicionados nas membranas celulares (NIXON *et al.*, 2018).

Localizado no braço curto do cromossomo 6 (6.p21.3), este gene tem papel fundamental na prevenção da hemocromatose, doença autossômica recessiva caracterizada pelo excesso de ferro no sangue, ocasionada na maioria das vezes, por mutações no gene *HFE* (LI *et al.*, 2014). O ferro é essencial para o metabolismo, porém em excesso pode levar a disfunção e danos em vários sistemas, devido sua toxicidade (SELVARAJ *et al.*, 2021).

Os sintomas iniciais da sobrecarga geralmente são fadiga, artralgia/artrite, dor abdominal, diminuição da libido e perda de peso. Os sinais clínicos mais frequentes são hepatomegalia, esplenomegalia e artropatia (SANTOS *et al.*, 2009). No entanto, como a deposição de ferro ocorre de forma gradativa e cumulativa, o aparecimento dos sintomas, na maioria dos casos, ocorre após a terceira década de vida, dificultando o diagnóstico precoce da doença (BONINI-DOMINGOS, 2006). Sem o tratamento adequado, com o decorrer do tempo, outros sintomas acrescentam-se, como fibrose portal, cirrose hepática e insuficiência hepática, adelgaçamento e hiperpigmentação da pele. O comprometimento cardíaco é uma das principais complicações da sobrecarga e de grande importância na morbimortalidade de pacientes com AF (SANTOS *et al.*, 2009).

A hemocromatose pode ser classificada em duas classes. A primeira é denominada hemocromatose hereditária (HH) e está relacionada com a homeostase do ferro, sendo dividida em quatro tipos diferentes (tipo 1, 2A, 2B e 3). A HH tipo 1 está ligada ao gene *HFE* e é consequente de três polimorfismos distintos, que são: *C282Y*, *H63D* e *S65C* (SOUTO; PUGLIESI; LOPES, 2016). A mutação para o polimorfismo *C282Y* ocorre em cerca de 90 a 95% dos pacientes com hemocromatose hereditária (NIXON *et al.*, 2018) e é consequência da transição de uma tirosina por uma cisteína no códon 282 do éxon 4. O polimorfismo *H63D* ocorre em cerca de 15 a 20% da população e decorre da transversão da histidina por um ácido aspártico na proteína e a mutação ocorre no éxon 2 do códon 63. Enquanto que a mutação para o polimorfismo *S65C* é responsável pela substituição de uma serina por uma cisteína, devido a

troca no éxon 2 e ocorre em cerca de 2 a 3% dos pacientes (GOUVEIA; RIBEIRO; CARRILHO, 2016; SOUTO; PUGLIESI; LOPES, 2016).

A segunda classe ocorre devido a mutações em genes responsáveis pela síntese de outras proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. A hemocromatose secundária depende de outros processos complementares, como por exemplo a sobrecarga devido a múltiplas transfusões de sangue. Nesse caso, é resultado de doenças congênitas ou adquiridas que resultam no excesso de ferro secundário, sendo as mais comuns: anemia hemolítica, anemia falciforme, talassemia beta maior, hepatopatias e eritropoiese ineficaz (SOUTO; PUGLIESI; LOPES, 2016).

Entretanto, a presença de mutação no gene *HFE* não é suficiente para o diagnóstico, porque a penetrância do alelo mutante e a expressão fenotípica da doença são relativamente baixas, tornando difícil prever o quadro clínico da doença (SANTOS *et al.*, 2009).

A HH está majoritariamente associada à homozigose para o genótipo *C282Y*, evidenciando a doença clínica, entretanto, como as mutações para *S65C* e *H63D* possuem penetrância reduzida, apesar da mutação para *H63D* ser mais frequente em caucasianos, quando em heterozigose composta com o gene *C282Y* (*C282Y/H63D* e *C282Y/S65C*) evidencia apenas uma sobrecarga moderada (GOUVEIA; RIBEIRO; CARRILHO, 2016).

As proteínas HFE resultantes das mutações alteram a homeostase do ferro celular e estão relacionadas a uma série de doenças inflamatórias e neuronais. Em especial no cérebro, micróglia e macrófagos são responsáveis por manter a homeostase e a modulação inflamatória associada com o processo patogênico de múltiplas doenças (NIXON *et al.*, 2018).

Nos macrófagos é realizada a reciclagem do ferro, através da degradação da hemoglobina. Estes detectam alterações químicas na membrana dos eritrócitos decorrentes do tempo na circulação ou de defeitos, submetendo-os à eritropoiese. O ferro é liberado do grupo heme, com a participação da enzima heme oxigenase, e a cadeia globínica é reaproveitada para sintetizar novas proteínas. Após ser liberado, pode ser armazenado no próprio macrófago, como ferritina, proteína responsável pelo armazenamento do ferro no organismo, quando sua saturação estiver normal ou aumentada; ou ser exportado pela ferroportina, uma proteína transmembrana com a função de transportar o ferro até a corrente sanguínea e, posteriormente, para a medula óssea; e oxidado a Fe^{3+} pela ceruloplasmina, a fim de facilitar a ligação ferro-transferrina. Tanto a ferritina quanto a ferroportina possuem o objetivo de evitar o estresse oxidativo, reduzindo sua reatividade, e facilitam a sua liberação para os locais de ação e estoque (SANTOS *et al.*, 2009; SOUTO; PUGLIESI; LOPES, 2016).

A hepcidina surgiu como a principal reguladora da homeostase, de forma a reduzir a exportação de ferro para o plasma devido sua interação com a ferroportina na superfície de enterócitos e macrófagos. A modulação da expressão de hepcidina deve-se ao gene *HFE*, devido a sua ligação com os receptores de transferrina. Em condições normais, o aumento do ferro estimula a secreção de hepcidina, o que promove redução da sua absorção e, assim, fica retido no macrófago, sob a forma de ferritina (SOUTO; PUGLIESI; LOPES, 2016).

Mutações nesse gene originam uma proteína incapaz de se ligar corretamente à transferrina, diminuindo a concentração plasmática de hepcidina e aumentando a quantidade de ferro não ligado a transferrina (CANÇADO; ALVARENGA; SANTOS, 2021). Na presença de anemia e hipóxia também são encontradas concentrações diminuídas de hepcidina. O ferro livre atua como catalizador de reações oxidativas e consequente síntese de radicais superóxidos e radicais hidroxilas, lesando a membrana celular, proteínas e DNA (SANTOS *et al.*, 2009).

A flebotomia terapêutica, também denominada sangria terapêutica, é o tratamento padrão para pacientes com hemocromatose, devido ao baixo custo, sendo muito eficaz e segura, de modo a prevenir danos aos tecidos e células por evitar às espécies reativas de oxigênio da sobrecarga. A flebotomia pode remover de 400 a 500mL de sangue, considerando o peso corporal, retirando aproximadamente de 200 a 250mg de ferro do corpo, a cada 1 a 4 meses, dependendo do estado de ferro do paciente (CANÇADO; ALVARENGA; SANTOS, 2021).

A terapia de quelação de ferro não é indicada para hemocromatose clássica. Porém, é um tratamento adjuvante em casos raros, como na sobrecarga grave sem eficácia com flebotomias (CANÇADO; ALVARENGA; SANTOS, 2021). Os quelantes de ferro são medicamentos administrados por via oral, por infusão subcutânea ou intravenosa, com substâncias capazes de se ligar a uma molécula de ferro. Após ser quelado, é excretado através das fezes, e sua eficácia é proporcional à dose administrada (SOUTO; PUGLIESI; LOPES, 2016).

Um dos pontos de entendimento de alteração fenotípica das células com as variantes *HFE* é que as células retículo endoteliais, especificamente os macrófagos, são pobres em ferro. A proteína *HFE* mediando a sua regulação nos macrófagos e sua relação com respostas inflamatórias pode ser o mecanismo de ligação entre doenças não relacionadas. O genótipo *HFE* impacta fundamentalmente em funções do macrófago como proliferação e sobrevivência (NIXON *et al.*, 2018). Esse pode ser o mecanismo pelo qual variantes *HFE* têm impacto no estado da doença falciforme.

Com relação à interação entre a anemia falciforme, processo inflamatório crônico, com hemocromatose hereditária, caracterizada pelo excesso de ferro no sangue, deve-se considerar que a sobrecarga pode levar pacientes falciformes a morte, devido a seus efeitos pró-inflamatórios que geram radicais hidroxila e danos oxidativos em organelas, membranas celulares e no DNA. O potencial inflamatório pode ser avaliado pela relação neutrófilo-linfócito (NLR) que apresentou 76% de especificidade e 85% de sensibilidade em estudo prévio, representando ser um bom marcador inflamatório em doença falciforme em pessoas com uso de hidroxiuréia. Da mesma forma, o número de monócitos circulantes pode inferir a quantidade de células ativadas em processos inflamatórios (LIU *et al.*, 2019; ZAHARAN *et al.*, 2020).

Além disso, os monócitos circulantes são referidos como protetores de lesão ao endotélio em anemias hemolíticas e fornecem proteção em eventos de vaso-oclusão e doença falciforme, pois normalmente esses monócitos limpam as células danificadas e detritos a partir da vasculatura. Um subset de monócitos (PMo) circulantes expressa altos níveis de Heme Oxigenase (HO-1), uma enzima degradante de heme com propriedades anti-inflamatórias, evidenciando que pessoas com evento vaso-oclusivo recente tem número reduzido de PMo e conseqüentemente de HO-1, prevenindo a fixação de hemácias falciformes ao endotélio e evitando a hemólise e oxidação (LIU *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A doença falciforme é consequência da seleção de uma mutação nos precursores eritróides, em pessoas de regiões da África, com sua subsequente migração para outras regiões, transmitindo os genes mutados ao longo das gerações. Por se tratar de uma doença com grande heterogeneidade fenotípica e diversidade de complicações sintomáticas, elevados índices da manifestação da doença na população mundial e a alta taxa de mortalidade dos pacientes falciforme, a doença tornou-se um problema de saúde pública.

Em busca de relacionar a anemia falciforme, processo inflamatório crônico, com hemocromatose hereditária, e o potencial inflamatório destacamos a importância deste estudo cujo propósito foi relacionar a gravidade dos sintomas de pacientes com doenças falciformes e os polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*); nesses pacientes é importante avaliar o potencial inflamatório por meio de alterações de leucócitos com fórmulas matemáticas e relação entre valores numéricos obtidos em hemograma.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar a frequência de variantes do gene *HFE* entre pacientes com doença falciforme e sua gravidade clínica e relacionar a expressão fenotípica da AF em pacientes em uso e sem uso de HU e respectiva concentração de ferritina com o índice NLR, a fim de identificar sua influência no processo inflamatório da doença.

3.2 Objetivos Específicos

Em pacientes com doenças falciformes e portadores dos polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*) estabelecer:

1. A relação do genótipo de doença falciforme com o genótipo das mutações no gene *HFE* por meio de avaliação de sintomas recorrentes;
2. A gravidade clínica dos portadores de anemia falciforme e mutação no gene *HFE* por meio de calculadora de risco eletrônica conforme definido por Belini Junior (2014);
3. A contagem de neutrófilos e linfócitos dos pacientes categorizados como baixo, normal e alto;
4. O índice leucocitário por meio de fórmula matemática nos pacientes anteriormente classificados como graves, intermediários e leves;
5. A concentração sérica de ferritina dos pacientes classificados como baixa, normal, alta e elevada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizadas amostras de DNA de 516 pessoas com doença falciforme, em estado estacionário da doença, em uso e sem uso de hidroxiuréia, de homens e mulheres, provenientes do estado do Rio de Janeiro. O projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) sob o protocolo número 006/11 e CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 0030.0.229.000-10, obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 466/2012 e adicionais, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Solicitamos dispensa de termo de consentimento, pois as informações foram obtidas a partir da reanálise de dados já coletados e anteriormente aprovados.

Todas as amostras foram submetidas à análise molecular para confirmar a doença falciforme, e as mutações em gene *HFE*. Verificaram-se 235 indivíduos com DF do sexo masculino e 281 do sexo feminino, com idades entre 6 e 65 anos. O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue pelo método de *salling-out* e a frequência de Hb S foi efetuada pelo método PCR RFLP. A frequência das três variantes do gene *HFE* (*H63D*, *C282Y* e *S65C*) foi analisada pelo método PCR RFLP.

A variabilidade fenotípica foi avaliada por meio de informações de prontuário e análise do hemograma e histórico clínico de cada paciente, caracterizando o *score* de gravidade da doença pela Calculadora da Gravidade da DF, validada em nosso laboratório na tese de doutorado “Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao uso de hidroxiureia na doença falciforme” (BELINI JUNIOR, 2014).

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de DNA (Método por precipitação salina ou *salling-out*) (SAMBROOK *et al.*, 1989 - modificado)

Princípio:

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de leucócitos de sangue periférico. O método é realizado em três etapas: lise das células sanguíneas, desproteinização, precipitação de DNA e ressuspensão. Os tampões de lise rompem os eritrócitos e glóbulos brancos.

Procedimento:

Amostras de sangue periférico foram colhidas com EDTA. Foi transferido 1 mL de sangue para um tubo de microcentrífuga de 1,6 mL estéril e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm à temperatura ambiente. O plasma foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 900 µL do Tampão 1x contendo Triton (5 mL do Tampão 10x + 45 mL de Triton). E após vortexar vigorosamente, foi novamente centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão e o sedimento lavado com 1 mL de Tampão 1x (5 mL do Tampão 10x + 45 mL de água milliQ) e, em seguida, centrifugado a 5000 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos. O procedimento foi repetido por 3 vezes ou até que o sedimento contendo os leucócitos esteja branco, isento de hemoglobina. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensado com 200 µL do Tampão 2 (1x) e homogeneizado. Acrescentou-se 20 µL de SDS à 10%. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por 15 minutos a 56°C. Foi adicionado 100 µL de NaCl (5M), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga estéril e o precipitado descartado. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo invertido até a precipitação do DNA. O material foi armazenado no congelador por no mínimo 30 minutos.

Posteriormente, o material foi centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e o etanol absoluto removido. O DNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e, em seguida, centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O etanol foi removido e o tubo deixado sobre um papel absorvente por aproximadamente 5 horas para que o etanol evapore por completo.

Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 30 µL de água destilada e depois incubado a 56°C por 15 minutos. E, por fim, a solução de DNA foi conservada em freezer a -20°C.

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

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

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

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

MgCl₂: Cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: modificado de LHGDH de SAIKI *et al.*, 1985.

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

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

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

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

μL: microlitros.

Fonte: LHGDH.

A mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para a enzima Dde I; assim após a digestão o alelo normal gerou 3 fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb e o alelo mutante gerou dois, um de 288 pb e outro de 88 pb. A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 1).

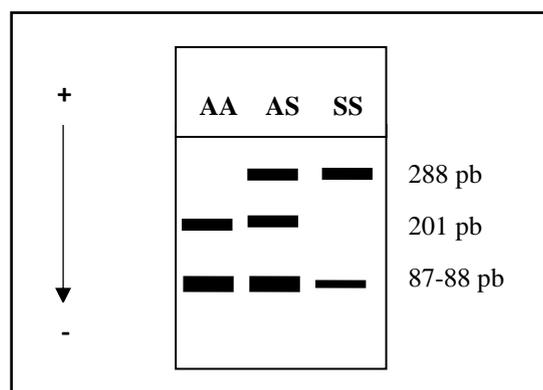


Figura 1. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para Hb S. AA: homocigoto selvagem. AS: heterocigoto para Hb S. SS: homocigoto para Hb S. pb: pares de bases.

Fonte: LHGDH.

4.2.3 Protocolo para detecção da mutação *H63D* no gene *HFE* PCR-RFLP

A detecção da mutação *H63D*, que altera o códon 63 da proteína, foi realizada por reação em cadeia da polimerase, seguida de análise de restrição de polimorfismo de fragmento único (PCR-RFLP). A sequência de primers utilizados para a amplificação foram: o L63 (*sense*): 5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3' e o R63 (*antisense*): 5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3'. O protocolo de amplificação está especificado na tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de amplificação para PCR da mutação *H63D*.

Mix	Concentração	Volume (µL)
H ₂ O	----	10,1
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,0
dNTP	1,25 mM cada	3,2
Primer L63	10 µM	2,5
Primer R63	10 µM	2,5
<i>Taq</i> (5U) Invitrogen ou Ludwig	5 U/µL	0,2
DNA molde	(100 ng/µL)	2,0
Volume final da reação		25 µL

MgCl₂: Cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: LHGDH.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: 95°C a três minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 45 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 60 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 32 ciclos de repetições (Tabela 4).

Tabela 4. Protocolo de ciclos para PCR da mutação H63D.

Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
95	3'	1 X
95	45"	
60	30"	30 X
72	60"	
72	5'	1 X
4	∞	

Fonte: LHGDH.

Após a amplificação, o fragmento de 496 pb foi analisado em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 Volts por 20 minutos. Em seguida, o fragmento foi digerido em banho-maria a 37°C (*Fermentas*) por cinco minutos. A enzima utilizada foi a Bcl I (T↓GATCA). O protocolo de digestão está especificado na tabela 5.

Tabela 5. Protocolo de digestão para RFLP da mutação H63D.

<i>FastDigest -Bcl I - Fermentas</i>	Volume (μL)
Tampão 1 X	1,0
<i>FastDigest</i> Bcl I (1FDU/μL)	0,3
H ₂ O	8,7
Produto de PCR	10,0

μL: microlitros.

Fonte: LHGDH.

A mutação no códon 63 (CAT → GAT), éxon 2, elimina um sítio de restrição da enzima Bcl I; assim após a digestão o alelo normal gerou 2 fragmentos de 352 pb e 144 pb, e o alelo mutante gerou 1 fragmento de 496 pb (Figura 2a). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 2b).

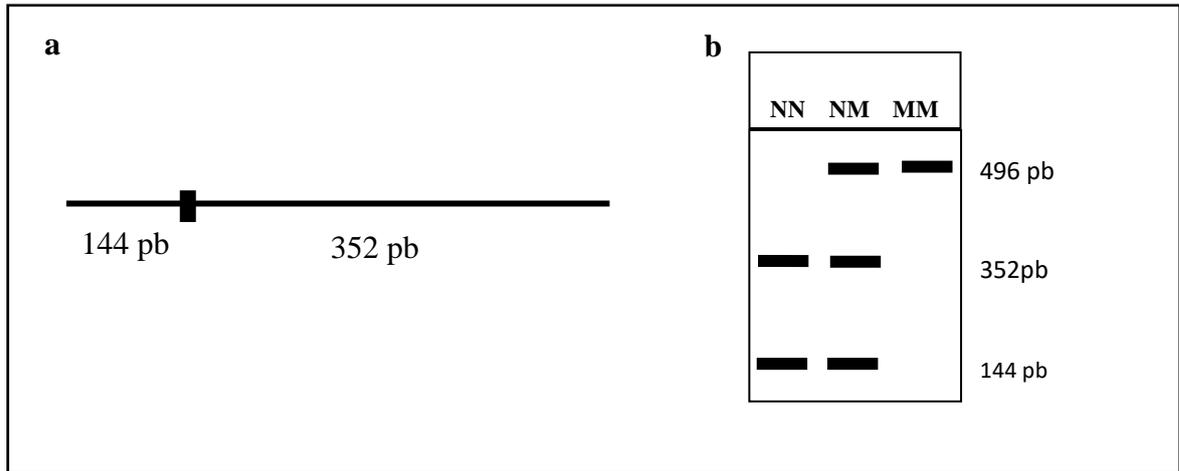


Figura 2a. Esquema do produto de PCR (4961 pb). Os sítios de restrição estão indicados pela barra. pb: pares de bases.

Figura 2b. Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para a mutação *H63D*. NN: homozigoto selvagem. NM: heterozigoto para *H63D*. MM: homozigoto para *H63D*. pb: pares de bases.

Fonte: LHGDH.

4.2.4 Protocolo para detecção da mutação *S65C* no gene *HFE* PCR-RFLP

A detecção da mutação *S65C*, que altera o códon 65 da proteína, foi realizada por reação em cadeia da polimerase, seguida de análise de restrição de polimorfismo de fragmento único (PCR-RFLP). A sequência de primers utilizados para a amplificação foram: o L63 (*sense*): 5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3' e o R63 (*antisense*): 5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3'. O protocolo de amplificação está especificado na tabela 6.

Tabela 6. Protocolo de amplificação para PCR da mutação S65C.

Mix	Concentração	Volume (µL)
H ₂ O	----	10,1
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,0
dNTP	1,25 mM cada	3,2
Primer L63	10 µM	2,5
Primer R63	10 µM	2,5
<i>Taq</i> (5U) Invitrogen ou Ludwig	5 U/µL	0,2
DNA molde	(100 ng/µL1)	2,0
Volume final da reação		25 µL

MgCl₂: Cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: LHGDH.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: 95°C a três minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 45 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 60 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 32 ciclos de repetições (Tabela 7).

Tabela 7. Protocolo de ciclos para PCR da mutação S65C.

Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
95	3'	1 X
95	45"	
60	30"	30 X
72	60"	
72	5'	1 X
4	∞	

Fonte: LHGDH.

Após a amplificação, o fragmento de 496 pb foi analisado em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 Volts por 20 minutos. Em seguida, o fragmento foi digerido em banho-maria a 37°C (*Fermentas*) por cinco minutos. A enzima utilizada foi a *Hinf I* (G↓ANTC). O protocolo de digestão está especificado na tabela 8.

Tabela 8. Protocolo de digestão para RFLP da mutação *S65C*.

<i>FastDigest -Hinf I - Fermentas</i>	Volume (μL)
Tampão <i>FastDigest</i>	1,0
<i>FastDigest Hinf I</i> (1FDU/μL)	0,5
H ₂ O	8,5
Produto de PCR	10,0

μL: microlitros.

Fonte: LHGDH.

A mutação no códon 65 (AGT > TGT), éxon 2, elimina um sítio de restrição da Enzima *Hinf I*; assim, após a digestão o alelo normal gerou 4 fragmentos de 274 pb, 147 pb, 69 pb e 6 pb, e o alelo mutante gerou 3 fragmentos de 274, 216 e 6 pb (Figura 3a). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 3b).

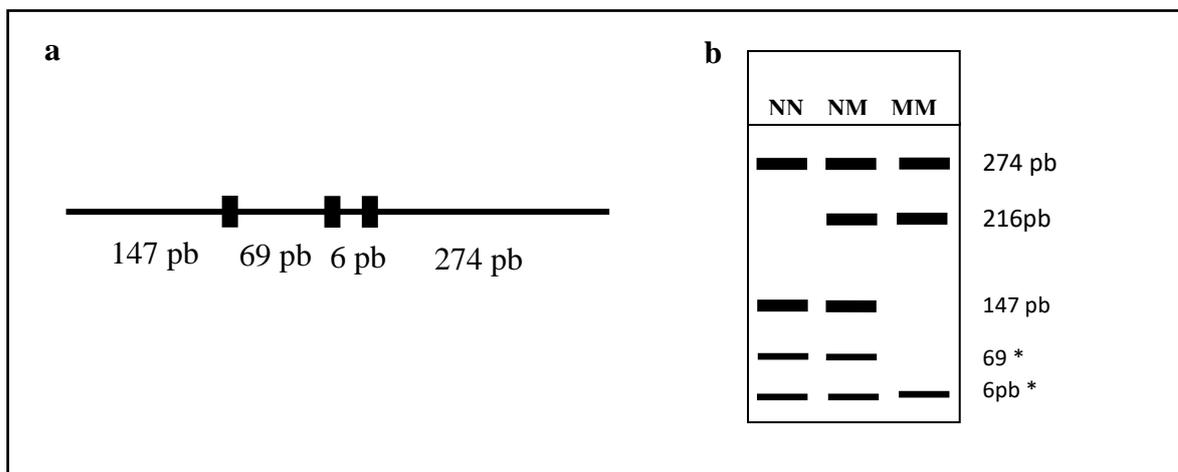


Figura 3a. Esquema do produto de PCR (496 pb). Os sítios de restrição estão indicados pela barra. pb: pares de bases.

Figura 3b. Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para a mutação *S65C*. NN: homocigoto selvagem. NM: heterocigoto para *S65C*. MM: homocigoto para *S65C*. pb: pares de bases. * bandas não visíveis.

Fonte: LHGDH.

4.2.5 Protocolo para detecção da mutação C282Y no gene *HFE* PCR-RFLP

A detecção da mutação C282Y, que altera o códon 282 da proteína, foi realizada por reação em cadeia da polimerase, seguida de análise de restrição de polimorfismo de fragmento único (PCR-RFLP). A sequência de primers utilizados para a amplificação foram: o L282 (*sense*): 5' GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC 3' e o R282 (*antisense*): 5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC 3'. O protocolo de amplificação está especificado na tabela 9.

Tabela 9. Protocolo de amplificação para PCR da mutação C282Y.

Mix	Concentração	Volume (µL)
H ₂ O	----	10,1
Tampão sem MgCl ₂	10 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2,0
dNTP	1,25 mM cada	3,2
Primer L282	10 µM	2,5
Primer R282	10 µM	2,5
<i>Taq</i> (5U) Invitrogen ou Ludwig	5 U/µL	0,2
DNA molde	(100 ng/µL1)	2,0
Volume final da reação		25 µL

MgCl₂: Cloreto de magnésio; dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados; mM: milimolar; µM: micromolar; µL: microlitros; ng: nanogramas.

Fonte: LHGDH.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: 95°C a três minutos para a desnaturação inicial; um ciclo com 30 repetições de 45 segundos a 95°C para a abertura da dupla-hélice do DNA, 30 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 60 segundos a 72°C para a extensão da fita por adição dos dNTPs; e um outro ciclo com uma repetição de 5 minutos a 72°C para extensão final da dupla hélice dos DNAs recém sintetizados, totalizando 32 ciclos de repetições (Tabela 10).

Tabela 10. Protocolo de ciclos para PCR da mutação C282Y.

Temperatura (°C)	Tempo	Repetições
95	3'	1 X
95	45"	
60	30"	30 X
72	60"	
72	5'	1 X
4	∞	

Fonte: LHGDH.

Após a amplificação, o fragmento de 441 pb foi analisado em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 Volts por 20 minutos. Em seguida, o fragmento foi digerido em banho-maria a 37°C (*Fermentas*) por cinco minutos. A enzima utilizada foi a Rsa I (GT↓AC). O protocolo de digestão está especificado na tabela 11.

Tabela 11. Protocolo de digestão para RFLP da mutação C282Y.

<i>FastDigest -Rsa I - Fermentas</i>	Volume (μL)
Tampão 1 X	1,0
<i>FastDigest</i> Rsa I (1FDU/μL)	0,3
H ₂ O	8,7
Produto de PCR	5,0

μL: microlitros.

Fonte: LHGDH.

A mutação no códon 282 (TGC > TAC), éxon 4, origina um sítio de restrição da Enzima *Rsa I*; assim, após a digestão o alelo normal gera 2 fragmentos de 296 e 145 pb, e o alelo mutante gera 2 fragmentos de 296, 116 e 29 pb (Figura 4a). A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 4b).

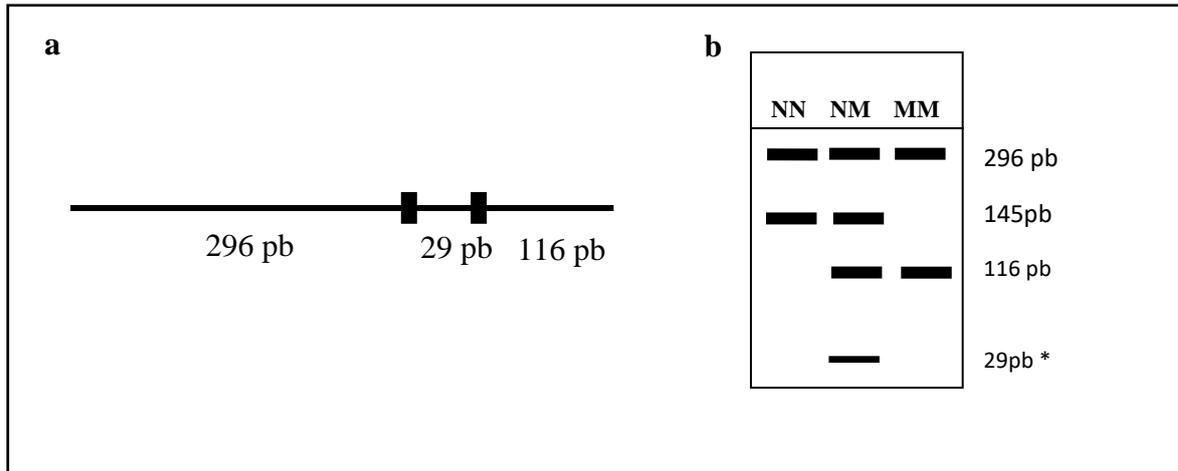


Figura 4a. Esquema do produto de PCR (441 pb). Os sítios de restrição estão indicados pela barra. pb: pares de bases.

Figura 4b. Representação esquemática dos possíveis produtos de digestão da PCR-RFLP para a mutação C282Y. NN: homocigoto selvagem. NM: heterocigoto para C282Y. MM: homocigoto para C282Y. pb: pares de bases. * bandas não visíveis.

Fonte: LHGDH.

4.2.6 Calculadora da gravidade da doença falciforme (BELINI JUNIOR, 2014)

Usamos a ferramenta "Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme", disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>, para o cálculo dos escores de gravidade e classificação dos pacientes em categorias por fenótipo (leve, intermediária, grave).

Os escores de gravidade calculados para este estudo incluiu as variáveis exigidas pela calculadora: idade, síndrome torácica aguda (STA), níveis de bilirrubina total, transfusão de sangue, níveis de lactato desidrogenase (LDH), volume corpuscular médio (VCM), crises de dor, priapismo, reticulócitos absoluto, gênero, acidente vascular encefálico (AVE), leucócitos totais, genótipo da doença falciforme e necrose avascular óssea. Os níveis de bilirrubina, LDH, VCM, reticulócito e leucócitos foram obtidos a partir da data da coleta das amostras para exames laboratoriais de rotina. Transfusão de sangue foi atribuída a pacientes que fazem transfusão de sangue regular por mais de um ano antes do início do estudo. Priapismo e STA foram considerados variáveis presentes em pacientes com esses eventos presentes próximo à data da coleta das amostras de sangue. As crises dolorosas foram consideradas presentes em pacientes que tiveram mais de três crises de episódios por pessoa, por ano, no último ano antes da data da coleta da amostra.

Dois parâmetros exigidos pela calculadora "Sepse" e "Pressão arterial sistólica" não puderam ser utilizados para este estudo, pois não estavam disponíveis nos prontuários médicos

de rotina no Brasil. Mesmo na ausência de qualquer variável clínica ou laboratorial, a calculadora permite que o pesquisador digite "não disponível" para a variável ausente. Assim, a calculadora fixa um valor de referência e as mudanças no risco de morte mudam de acordo com as demais variáveis preenchidas.

4.2.7 Índice Leucocitário

O perfil leucocitário foi obtido por meio da relação neutrófilo-linfócito (NLR), sendo um potencial marcador inflamatório, e seu cálculo é fortemente indicado para predição em pacientes com doença falciforme (ZHRAN *et al.*, 2020). Pode ser calculado pela divisão entre os valores de neutrófilos e linfócitos séricos, com base em hemácias, a partir de dados hematológicos realizados no momento da coleta das amostras em equipamento automatizado. A razão indica uma condição de estresse crônico e quando há um aumento da quantidade de neutrófilos, há uma diminuição da quantidade de linfócitos circulantes. Quanto mais próximo de 1 o valor resultante, maior o índice de estresse.

4.2.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com os *softwares* *Statistica 10.0* e *Graphpad Prism 5.0*. Os dados foram apresentados em porcentagem, de acordo com a frequência apresentada, expressos como média \pm desvio padrão e testados quanto à distribuição normal usando o teste de *Shapiro-Wilk*. Avaliada a não normalidade, o teste não paramétrico de *Qui-Quadrado* foi efetuado para a associação entre os genótipos de anemia falciforme e de HH. Em seguida, foi calculada a frequência alélica para a DF entre os heterozigotos e homozigotos das mutações no gene *HFE*. Testamos a associação entre os alelos das mutações no gene *HFE* e a gravidade da doença pelo teste de *Qui-Quadrado* para a AF. O teste de *Qui-Quadrado* foi realizado para a associação entre as variáveis gênero, uso ou não de HU, número de neutrófilos e de linfócitos.

Para avaliar o grau de associação entre as variáveis estudadas na AF, foi realizado o teste não paramétrico de *three-way* ANCOVA, a partir do modelo linear geral (GLM). O gênero foi considerado como uma covariável, o índice leucocitário como uma variável dependente, e a presença ou ausência da mutação *H63D*, o uso ou não de hidroxiuréia, a gravidade da doença

e a concentração de ferritina como variáveis independentes. Os resultados foram descritos com nível estatisticamente significativo de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A relação do genótipo da DF com o genótipo das mutações no gene *HFE* envolveu a análise de 516 pessoas com DF. Para o sexo masculino, encontramos 181 pacientes (77,02%) homocigotos para a Hb S, 36 (15,32%) com a dupla heterocigose Hb S e Hb C, 12 (5,11%) com a interação Hb S/Beta talassemia e 6 (2,55%) com a dupla heterocigose Hb S e Hb D (Figura 5). Para o sexo feminino, verificamos 235 pacientes (83,63%) homocigotos para a Hb S, 32 (11,39%) com a dupla heterocigose Hb S e Hb C, 8 (2,85%) com a interação Hb S/Beta talassemia e 6 (2,14%) com a dupla heterocigose Hb S e Hb D.

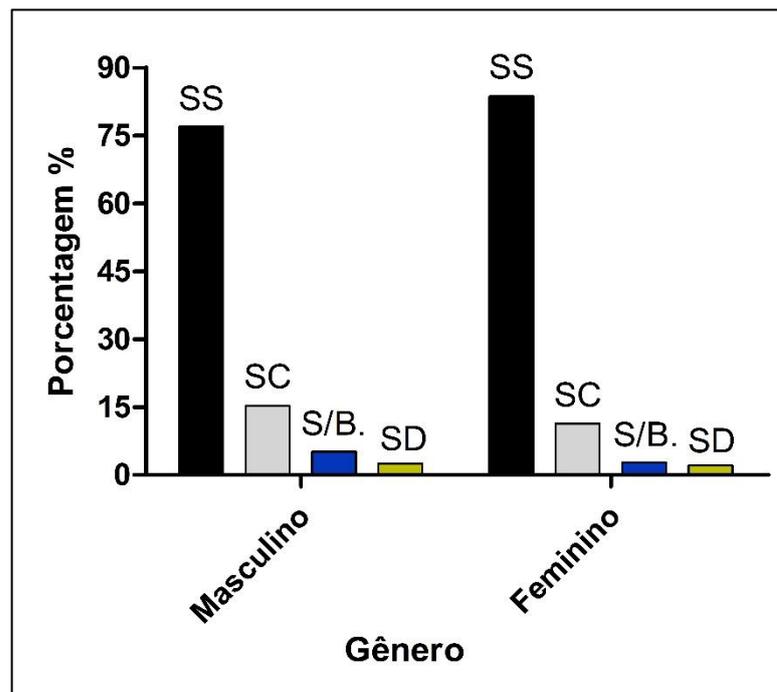


Figura 5. Caracterização do genótipo de hemoglobina. O gráfico de barra mostra a distribuição do genótipo de hemoglobina entre o sexo masculino e o sexo feminino. A maior porcentagem foi observada nos homocigotos para a Hb S (SS), seguido da dupla heterocigose Hb S e Hb C (SC), da interação Hb S/Beta talassemia (S/B.) e a dupla heterocigose Hb S e Hb D (SD) com a menor.

As amostras que apresentaram DF foram submetidas a análises moleculares para a caracterização da mutação no gene *HFE*. Foram avaliados 1548 alelos e para a mutação *H63D*, encontramos 254 genótipos homocigotos de tipo selvagem, 256 genótipos heterocigotos e 6 genótipos homocigotos mutantes (Tabela 12). Para a mutação *C282Y*, encontramos 502 genótipos homocigotos selvagens, 14 genótipos heterocigotos e nenhum genótipo homocigoto mutante. Para a mutação *S65C*, encontramos 512 genótipos homocigotos selvagens, 4 genótipos heterocigotos e nenhum genótipo homocigoto mutante.

Tabela 12. Perfil das mutações no gene *HFE* no genótipo de hemoglobina.

Genótipo de Hb	Perfil de mutações no gene <i>HFE</i>								
	<i>H63D</i>			<i>C282Y</i>			<i>S65C</i>		
	W/W	W/M	M/M	W/W	W/M	M/M	W/W	W/M	M/M
SS	199	212	5	404	12	0	413	3	0
S/Beta tal.	7	13	0	20	0	0	20	0	0
SC	40	28	0	67	1	0	67	1	0
SD	8	3	1	11	1	0	12	0	0
Total	254	256	6	502	14	0	512	4	0

A tabela demonstra o total dos genótipos de hemoglobina com cada mutação no gene *HFE*. W/W: homocigoto selvagem. W/M: heterocigoto. M/M: homocigoto mutante.

Em razão das hemoglobinas variantes Hb S/Beta talassemia, Hb SC e Hb SD possuírem menor ocorrência na DF, foi utilizado a Hb S em homocigose (Hb SS) para a análise de frequência, indicando, pelo teste de *Qui-Quadrado*, que não ocorreram diferenças significativas entre os genótipos homocigotos selvagens, heterocigotos e homocigotos mutantes para os polimorfismos *H63D* ($X^2=3,00$; $p=0,22$), *C282Y* e *S65C* ($X^2=6,00$; $p=0,20$) (Figura 6).

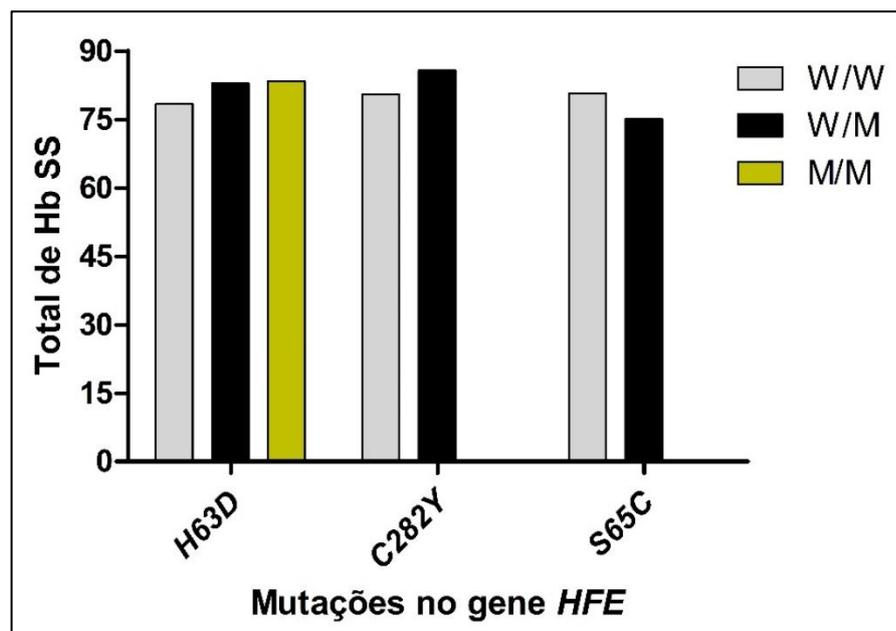


Figura 6. Total do genótipo de Hb SS nas mutações do gene *HFE*. O gráfico de barra exibe o número total da anemia falciforme para cada polimorfismo no gene *HFE*. W/W: homocigoto selvagem. W/M: heterocigoto. M/M: homocigoto mutante.

Uma vez que não foi encontrada diferença entre o genótipo de AF para as mutações no gene *HFE*, avaliamos a frequência alélica das mutações nos genótipos de hemoglobina. A tabela 13 demonstra que há maior incidência dos alelos mutantes para os três polimorfismos.

Tabela 13. Frequência alélica do gene *HFE* no genótipo de hemoglobina.

Genótipo de Hb		<i>H63D</i>		<i>C282Y</i>		<i>S65C</i>	
		n°	F	n°	F	n°	F
SS	W	610	0.733	820	0.986	829	0.996
	M	222	0.267	12	0.014	3	0.004
Total Alelos		832	1	832	1	832	1
S/Beta tal.	W	27	0.675	40	1	40	1
	M	13	0.325	0	0	0	0
Total Alelos		40	1	40	1	40	1
SC	W	108	0.794	135	0.993	135	0.993
	M	28	0.206	1	0.007	1	0.007
Total Alelos		136	1	136	1	136	1
SD	W	19	0.792	23	0.958	24	1
	M	5	0.208	1	0.042	0	0
Total Alelos		24	1	24	1	24	1

A tabela expressa a frequência de cada alelo para a mutação no gene *HFE*. W: alelo selvagem. M: alelo mutante. F: frequência alélica.

Em seguida, classificamos os pacientes quanto à gravidade para os 1248 alelos da AF. Para o polimorfismo *H63D* no homocigoto selvagem, 66 indivíduos apresentam uma gravidade leve, 87 foram moderados e 46 apresentam o estado grave da doença; no heterocigoto, 60 indivíduos apresentam gravidade leve, 90 foram moderados e 62 foram graves; e no homocigoto mutante, 3 indivíduos foram leves e 2 graves (Figura 7a). Assim, verificamos uma associação pelo teste de *Qui-Quadrado* entre os alelos e a gravidade da doença ($X^2=21,61$; $p<0,05$).

Para o polimorfismo *C282Y* no homocigoto selvagem, 124 indivíduos apresentam uma gravidade leve, 176 foram moderados e 104 apresentam o estado grave da doença; e no heterocigoto, 5 indivíduos apresentam gravidade leve, 3 foram moderados e 5 foram graves (Figura 7b). Entretanto, o teste de *Qui-Quadrado* mostrou que não há associação entre os genótipos e a gravidade ($X^2=1,64$; $p=0,44$).

Para o polimorfismo *S65C* no homocigoto selvagem, 127 indivíduos foram leves, 179 foram moderados e 107 apresentam o estado grave da doença; e no heterocigoto, 2 indivíduos

apresentam gravidade leve e 1 foi grave (Figura 7c). Mas nenhuma evidência de relação pelo teste de *Qui-Quadrado* foi encontrada ($X^2=2,60$; $p=0,27$).

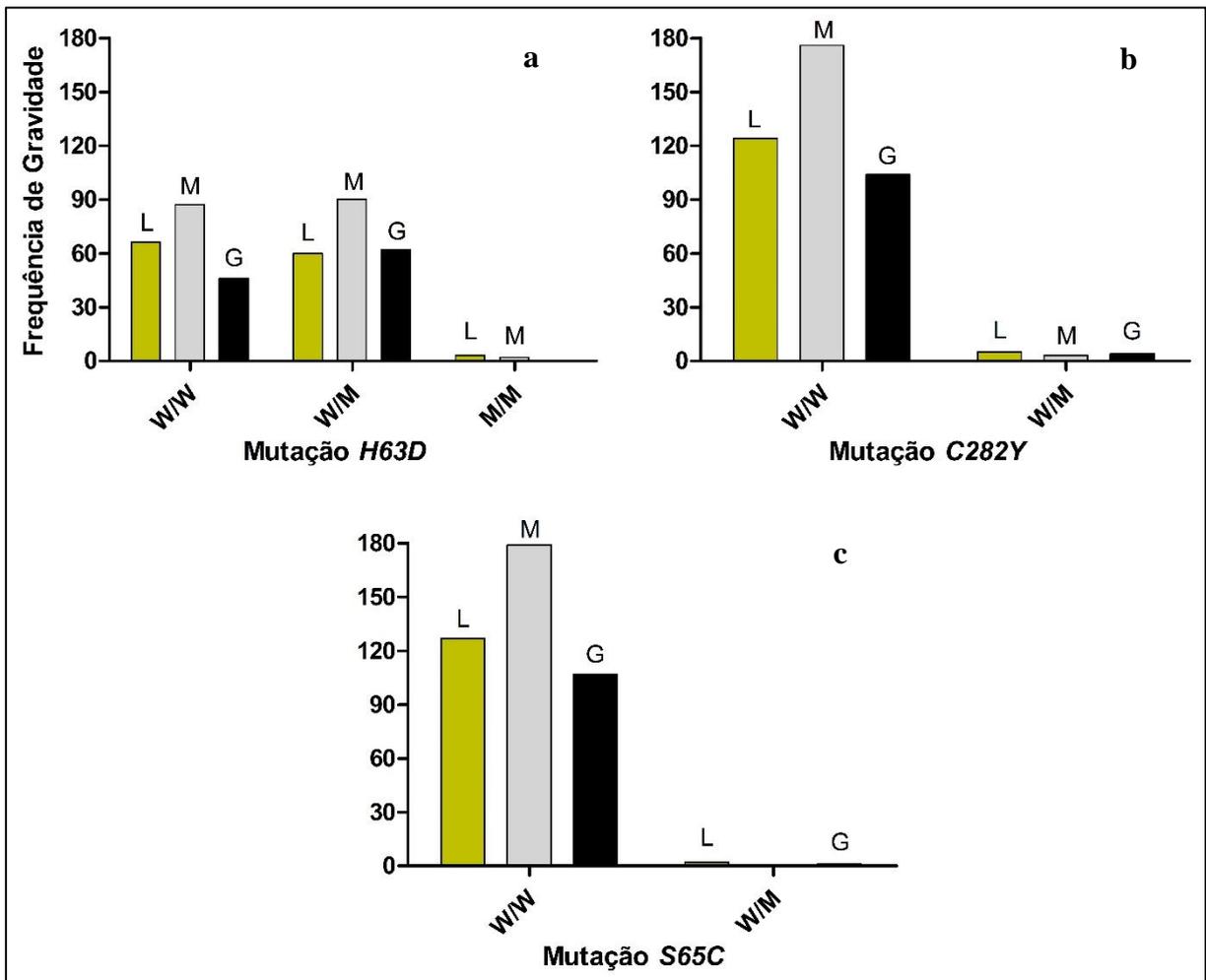


Figura 7a. Frequência da gravidade da AF na mutação *H63D*. **Figura 7b.** Frequência da gravidade da AF na mutação *C282Y*. **Figura 7c.** Frequência da gravidade da AF na mutação *S65C*. Os gráficos de barra exibem a frequência da anemia falciforme para cada polimorfismo no gene *HFE*. W/W: homocigoto selvagem. W/M: heterocigoto. M/M: homocigoto mutante. L: leve. M: moderado. G: grave.

Os pacientes em uso de HU apresentaram uma menor contagem de neutrófilos absolutos e uma redução de linfócitos comparado com os sem uso de HU. O gênero masculino apresentou médias e desvio padrão Neutrófilo/ComHU ($4,85 \pm 2,30$), Neutrófilo/SemHU ($5,41 \pm 3,41$), Linfócito/ComHU ($3,51 \pm 1,53$) e Linfócito/SemHU ($4,38 \pm 1,34$); e o feminino apresentou Neutrófilo/ComHU ($4,77 \pm 2,97$), Neutrófilo/SemHU ($5,95 \pm 2,48$), Linfócito/ComHU ($3,30 \pm 1,19$) e Linfócito/SemHU ($3,78 \pm 1,30$). Categorizamos o neutrófilo como baixo para valores menores que $1500 \mu\text{L}$, normal para valores entre 1500 e $7000 \mu\text{L}$ e alto para valores maiores que $7000 \mu\text{L}$. O linfócito foi categorizado como baixo para valores menores que $1000 \mu\text{L}$, normal para valores entre 1000 e $4000 \mu\text{L}$ e alto para valores maiores que $4000 \mu\text{L}$. O teste de

Qui-Quadrado evidenciou uma associação estatisticamente significativa para o gênero, uso ou não de hidroxiuréia, número de neutrófilos e de linfócitos ($p < 0,05$).

Tabela 14. Número de neutrófilos e linfócitos em pacientes com AF em uso e sem uso de hidroxiuréia.

Gênero		Neutrófilos			Linfócitos		
		Baixo	Normal	Alto	Baixo	Normal	Alto
Masculino	Com HU	2	77	15	1	67	26
	Sem HU	1	71	15	0	36	51
Feminino	Com HU	1	90	13	0	79	25
	Sem HU	0	91	40	0	80	51

A tabela mostra a contagem de neutrófilos e linfócitos classificados como baixo, normal e alto em pacientes do gênero masculino e feminino com anemia falciforme em uso e sem uso de hidroxiuréia.

Por fim, as médias e desvio padrão para o índice leucocitário em uso e sem uso de hidroxiuréia foram NLR/ComHU ($1,62 \pm 1,27$) e NLR/SemHU ($1,62 \pm 1,04$). A fim de verificar a associação do NLR foi utilizado o teste *three-way* ANCOVA e verificamos que a covariável gênero ($p=0,05$) e as variáveis presença ou ausência da mutação *H63D* ($p=0,35$), o uso ou não de hidroxiuréia ($p=0,88$) e a gravidade da doença ($p=0,28$) não apresentaram diferenças significativas na AF (Figura 8).

As médias e desvio padrão para a ferritina, em uso e sem uso de hidroxiuréia, foram FERRITINA/ComHU ($1165,55 \pm 1715,81$) e FERRITINA/SemHU ($989,80 \pm 1586,30$). Classificamos a ferritina como baixa para pacientes com valores menores que $23 \mu\text{g/L}$, normal para valores entre 23 e $336 \mu\text{g/L}$, alto entre 337 e $1000 \mu\text{g/L}$ e elevada para valores maiores que $1000 \mu\text{g/L}$ e encontramos diferenças estatisticamente significativas na AF ($p=0,04$).

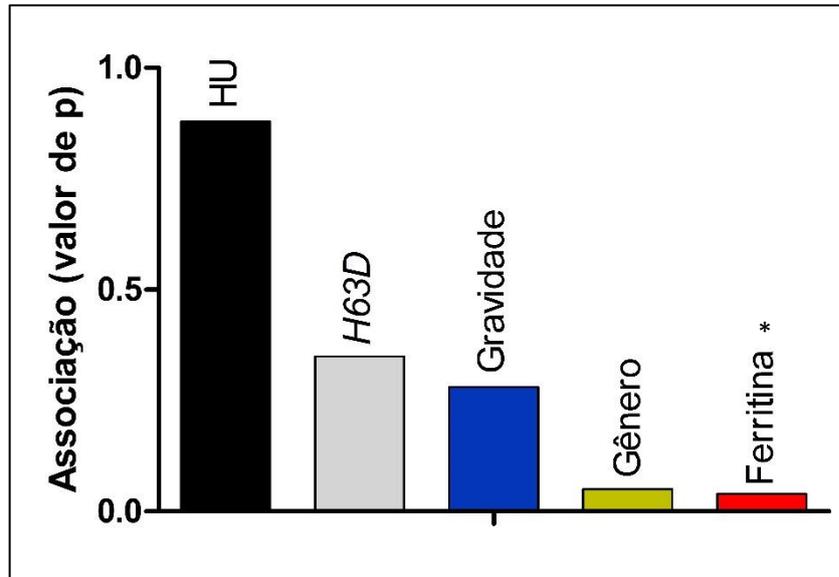


Figura 8. Associação do NLR com variáveis. O gráfico de barra mostra o valor de associação entre as variáveis uso ou não de hidroxiuréia, presença ou ausência da mutação *H63D*, gravidade da doença, gênero e a concentração de ferritina. * Estatisticamente significativo $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

As evidências clínicas e epidemiológicas da doença falciforme mostram o impacto significativo na morbimortalidade da população acometida pela doença, sendo caracterizada como um problema de saúde pública mundial (SAUTCHUK *et al.*, 2021). No presente estudo, foi observado na amostra grande frequência das hemoglobinas variantes Hb S e a Hb C, principalmente devido às diferenças genéticas encontradas na população brasileira. No Brasil, as hemoglobinas variantes mais frequentes são a Hb S e a Hb C, ambas de origem africana, demonstrando a vasta heterogeneidade genética, devido a formação da população a partir de diferentes graus de miscigenação, e a importância desse grupo para a composição das regiões do país (CARDOSO *et al.*, 2017).

A hemocromatose hereditária está associada ao gene *HFE* e impacta consideravelmente os níveis de ferro no organismo e o fenótipo do macrófago. Os macrófagos desempenham uma função importante no envolvimento de respostas inflamatórias. Os genótipos *H63D*, *C282Y* e *S65C* impactam em funções críticas dos macrófagos, como os perfis de citocinas, migração e fagocitose (NIXON *et al.*, 2018), afetando o estado da doença falciforme, pela diminuição da resposta inflamatória.

A frequência dos genótipos *HFE* é variável entre as diferentes regiões geográficas e populações. No presente estudo, o perfil das mutações no gene *HFE* para o genótipo de hemoglobina indicou alta prevalência dos heterozigotos para a mutação *H63D* (256 indivíduos), principalmente em conjunto com a anemia falciforme (212); uma prevalência intermediária dos heterozigotos para a mutação *C282Y* (14 indivíduos), com ausência dos alelos homozigotos; e um número baixo de heterozigotos para a mutação *S65C* (4 indivíduos), com ausência dos alelos homozigotos, um reflexo da formação étnica da população. Apesar dessa diferença, não houveram associações entre a homozigose e heterozigose para a anemia falciforme. A análise da frequência alélica para a doença falciforme corroborou o equilíbrio entre os alelos do gene *HFE*, em função de não ocorrerem abruptas mudanças nas frequências dos alelos mutantes.

Entretanto, a Hb S tem ancestralidade africana e a mutação *H63D* também é frequente na África. No Brasil, a cada ano, nascem 3.000 crianças com doença falciforme. No Estado do Rio de Janeiro, a incidência entre os nascidos vivos é de 1:1.200. Para a população global, a heterozigosidade e homozigosidade para a *H63D* foram encontradas em 19,4% e 1,9%, respectivamente. No Rio de Janeiro, uma amostra obtida evidenciou 12% de heterozigotos

H63D (CALVO-GONZÁLEZ, 2014; SELVARAJ *et al.*, 2021). Logo, a DF e a mutação *H63D* são marcadores importantes para a população brasileira.

Embora a mutação *C282Y* em homozigose mutante tenha maior penetrância, ela é rara na população mundial, principalmente nas populações africanas, sendo altamente prevalente em caucasianos da Europa e na América do Norte. Uma frequência de cerca de 9,0% é observada, na população, em heterozigotos *C282Y* e menos de 1,0% carrega a variante homozigótica. Uma frequência entre 0 e 0,5% da variante heterozigótica e nenhuma variante homozigótica foi relatada em asiáticos, no subcontinente indiano, no africano, no Oriente Médio e em australianos (SELVARAJ *et al.*, 2021).

A mutação *S65C* causa apenas formas mais leves de hemocromatose hereditária, do qual foi relatado uma frequência baixa ou até ausente em todos os continentes, exceto nos países europeus, com uma prevalência de 14,4 a 0,69% (SELVARAJ *et al.*, 2021), confirmando a menor frequência do alelo encontrado na amostra.

Essa contraposição provavelmente ocorre devido a diversidade étnica da população brasileira, com as pessoas trazidas ao Brasil durante o período de tráfico e os posteriores intensos movimentos migratórios, contribuindo com diversas características para a população (CALVO-GONZÁLEZ, 2014), com a presença dos genótipos em várias regiões do Brasil.

A evidência de associação significativa para o polimorfismo *H63D* exhibe que o genótipo influencia a gravidade para a AF. E que os polimorfismos *C282Y* e *S65C* não estão associados ao risco da AF. Uma possível explicação é que o genótipo heterozigoto *H63D* é mais comum no Brasil e, portanto, os genótipos *C282Y* e *S65C* possuem falta de expressividade na presença da mutação, não sendo suficiente para estabelecer uma relação de significância.

Desse modo, a mutação *H63D* foi utilizada para análise de associação com o índice leucocitário na AF. Ainda que não houveram relações do NLR com as variáveis, o gênero apresentou o menor valor de p, dado que homens e mulheres têm diferentes perfis leucocitários, com diferentes respostas à inflamação.

As propriedades anti-inflamatórias da HU na AF foram evidenciadas pela redução da contagem dos neutrófilos e de linfócitos, obtendo uma associação com o gênero feminino e masculino. Ao realizar a contagem de neutrófilos foi possível observar que mulheres possuem maior número em uso de hidroxiuréia (104) e sem uso (131), com possível prevalência de neutrofilia relativa (23%). Comparado com os homens, com menor contagem de neutrófilos em

uso de HU (94) e sem uso (87), com ocorrência de neutropenia relativa (2%). Entretanto, o aumento ou diminuição do número absoluto de neutrófilos deve ser confirmado com hemogramas repetidos e considerar a individualidade de cada indivíduo, podendo variar com a magnitude das manifestações da AF, a população e as condições imunológicas do paciente (FAILACE, 2003; SANTOS; SILVÉRIO; ORFÃO, 2015; TOLEDO *et al.*, 2020).

A avaliação da contagem de linfócitos também demonstrou que mulheres possuem maior número em uso de hidroxiuréia (104) e sem uso (131), com incidência de linfocitose relativa (32%). Comparado com os homens, com menor contagem em uso de HU (94) e sem uso (87), com possível prevalência de linfopenia relativa (1%). As alterações leucocitárias estão relacionadas com a AF, sendo relatado prevalência de leucopenia em homens e leucocitose em mulheres. Além disso, sabe-se que negros possuem de 20 a 25% de um menor número de leucócitos circulantes quando comparada aos caucasianos (FAILACE, 2003; SANTOS; SILVÉRIO; ORFÃO, 2015), tornando-se necessário o acompanhamento para uma correta interpretação e um diagnóstico diferencial.

A ferritina é uma proteína responsável pelo armazenamento de ferro no organismo e apresentou relação com o NLR. Assim, indivíduos com a constatação de sobrecarga de ferro por concentrações séricas persistentemente elevadas de ferritina, $>200 \mu\text{g/L}$ em mulheres e $>300 \mu\text{g/L}$ em homens, é indicado realizar o diagnóstico de HH, para confirmar a presença das mutações *H63D*, *C282Y* e *S65C*, devido ao acúmulo de radicais livres nas células. A ferritina também pode estar aumentada em processos inflamatórios, causados pela HH e pela anemia hemolítica crônica (SANTOS *et al.*, 2009). Das 70 amostras *H63D* com níveis mais elevados de ferritina e com pacientes em uso de hidroxiuréia, o maior número de gravidade foi encontrada para a moderada (33 pacientes); e das 49 amostras *H63D* com níveis elevados e sem uso de hidroxiuréia, foram predominantes em pacientes graves (20). Em um estudo foi observado que o uso de hidroxiuréia na AF por dois anos pode diminuir altos níveis de ferritina sérica (ITALIA *et al.*, 2009). Isso indica que as variantes *H63D* que exibiram sobrecarga de ferro com níveis elevados de ferritina e casos mais graves de AF podem ter uma agravação da absorção de ferro.

Além disso, o índice NLR, obtido a partir da relação de neutrófilos por linfócitos, representa um biomarcador de inflamação, em razão de que pacientes com AF apresentam níveis aumentados do estado de pró-inflamação, que levam a ativação endotelial crônica, agregação de leucócitos e adesão de hemácias. O tratamento com hidroxiuréia age de modo a aumentar os níveis de Hb F, desempenhando um papel essencial na redução dos leucócitos

totais e outras células imunológicas, e na diminuição significativa do NLR (ZAHHRAN *et al.*, 2020). Enquanto que as mutações no gene *HFE* podem promover o aumento da migração de linfócitos, por meio da secreção de proteínas quimioatraentes, e podem recrutar monócitos a partir dos macrófagos (NIXON *et al.*, 2018), para mediação da inflamação.

Por isso, a avaliação da proporção dos leucócitos na gravidade da AF em conjunto com a HH é importante, visto que os neutrófilos representam um mediador inflamatório inespecífico ativo da imunidade inata e os linfócitos medeiam o aspecto protetor da inflamação, e reduzir suas contagens absolutas é terapêutico, pois neutrófilos podem promover crises vaso-oclusivas por meio da adesão vascular em condições inflamatórias adversas (ZAHHRAN *et al.*, 2020).

Além disso, a presença do polimorfismo *H63D* em casos de gravidade clínica alta podem levar pacientes portadores de AF à morte, devido aos efeitos pró-inflamatórios, o que conduz a um número insuficiente de dados para análise. Consequentemente, mais estudos e dados relativos ao efeito da HH entre a AF devem ser feitos, principalmente análises com outros tipos de leucócitos totais e avaliar citocinas pró-inflamatórias, para determinação do fator de risco.

7. CONCLUSÕES

Em suma, o genótipo de anemia falciforme não está associado com a homozigose e heterozigose para os genótipos de HH e os alelos encontram-se em equilíbrio. O polimorfismo *H63D* apresenta diferenças significativas com relação à gravidade da doença, e os polimorfismos *C282Y* e *S65C* não apresentam diferenças significativas. O índice leucocitário não exibe diferenças significativas na AF para as variáveis gênero, presença ou ausência da mutação *H63D*, o uso ou não de HU e a gravidade da doença. Demonstra diferenças para a concentração de ferritina, indicando que a variante *H63D* com níveis elevados de ferritina podem ter uma agravação da absorção de ferro.

Poucos estudos e dados relativos ao efeito da hemocromatose hereditária entre a doença falciforme foram feitos, enquanto nenhum estudo anterior está disponível sobre o índice leucocitário nas as variantes do gene *HFE* e sua relação com a AF. As variantes do gene *HFE* envolvidas no metabolismo do ferro são caracterizadas por aumento da absorção de ferro e toxicidade aos órgãos devido à sobrecarga de ferro. Da mesma forma, a condição da DF está associada a níveis variáveis de absorção de ferro, dependendo do grau de eritropoiese ineficaz que, por sua vez, leva à sobrecarga de ferro. Análises de outros leucócitos totais e citocinas pró-inflamatórias durante o tratamento de HU são notavelmente necessários para que seja possível traçar o perfil dos portadores dos genes que estão predispostos a desenvolverem quadros clínicos mais graves e dar aos profissionais da saúde mais dados para traçar estratégias para um suporte mais eficaz aos pacientes, melhorando a qualidade de vida desses indivíduos.

8. REFERÊNCIAS

- ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52-56, jan. 2017.
- BALLAS, S. K. *et al.* Definitions of the Phenotypic Manifestations of Sickle Cell Disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6-13, jan. 2010.
- BALLAS, S. K.; DARBARI, D. S. Review/Overview of Pain in Sickle Cell Disease. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 49, p. 102327, fev. 2020.
- BELINI JUNIOR, E. *et al.* Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 4, p. 321-327, abr. 2015.
- BELINI JUNIOR, E. Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao uso de hidroxiureia na doença falciforme. São José do Rio Preto - SP, fev. 2014.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemocromatose hereditária e as mutações no gene HFE. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, p. 241-242, dez. 2006.
- CALVO-GONZÁLEZ, E. Sobre escravos e genes: “origens” e “processos” nos estudos da genética sobre a população brasileira. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 21, n. 4, p. 1113-1129, out. 2014.
- CANÇADO, R. D.; ALVARENGA, A. M.; SANTOS, P. C. J. L. HFE hemochromatosis: an overview about therapeutic recommendations. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. xxx, n. xx, p. 1-5, nov. 2021.
- CANÇADO, R. D. *et al.* Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para uso de Hidroxiuréia na Doença Falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, out. 2009.
- CARDOSO, C. D. S. *et al.* Triagem neonatal de hemoglobinopatias no estado do Rio Grande do Sul no período de 2004 a 2014. **Boletim Científico de Pediatria**, v. 6, n. 3, p. 77-84, mar. 2017.
- GOUVEIA, S.; RIBEIRO, C.; CARRILHO, F. Avaliação do impacto da sobrecarga de ferro na diabetes *mellitus* tipo 1. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 11, n. 1, p. 30-33, jan. 2016.
- GRILO, P. M. S. Incidência das Hemoglobinopatias em Recém-nascidos do Estado de Mato Grosso do Sul. Três Lagoas - MS, set. 2021.
- INUSA, B. P. D. *et al.* Sickle Cell Disease - Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 2, jun. 2019.

- ITALIA, K. *et al.* Hydroxyurea in sickle Cell Disease – A study of clinico-pharmacological efficacy in the Indian haplotype. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 42, n. 1, p. 25-31, jan. 2009.
- LI, M. *et al.* Mutations in the HFE gene and sporadic amyotrophic lateral sclerosis risk: a meta-analysis of observational studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 215-222, mar. 2014.
- LIU, Y. *et al.* Patrolling monocytes in sickle cell hemolytic conditions. **Transfusion Clinique at Biologique**, v. 26, n. 2, p.128-129, mai. 2019.
- MOUSINHO-RIBEIRO, R. D. C. *et al.* Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 1-9, abr. 2008.
- NIXON, A. M. *et al.* The role of HFE genotype in macrophage phenotype. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 30, p. 1-11, fev. 2018.
- 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, dez. 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, L. A.; SILVÉRIO, A. D. S. D.; ORFÃO, L. H. Perfil Leucocitário de uma População do Sul de Minas Gerais. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 506-513, jul. 2015.
- SANTOS, P. C. J. L. *et al.* Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 3, p. 192-202, jan. 2009.
- SAUTCHUK, T. L. S. *et al.* Frequência do Traço Falciforme em Doadores de Sangue. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 43, n. 1, p. 345, out. 2021.
- SEBASTIANI, P. *et al.* A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2727-2735, out. 2007.
- SELVARAJ, B. *et al.* Frequency of hereditary hemochromatosis gene mutations and their effects on iron overload among beta thalassemia patients of Chennai residents. **AIMS Molecular Science**, v. 8, n. 4, p. 233-247, nov. 2021.
- SOARES, L. F. *et al.* Prevalência de hemoglobinas variantes em comunidades quilombolas no estado do Piauí, Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 11, p. 3773-3780, nov. 2017.
- SOUTO, N. L. R.; PUGLIESI, P. R.; LOPES, I. C. R. Hemocromatose hereditária: revisão de literatura. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 26, n. 1791, p. 1-8, jan. 2016.

- SOUZA, J. M. D. *et al.* Fisiopatologia da Anemia Falciforme. **Revista Transformar**, v. 8, n. 8, p. 162-179, jan. 2016.
- THEIN, S. L. Genetic Basis and Genetic Modifiers of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1013, p. 27-57, nov. 2017.
- THOM, C. S. *et al.* Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 3, p. 1-22, mar. 2013.
- TOLEDO, S. L. O. *et al.* Avaliação das Razões Neutrófilo/Linfócito e Plaqueta/Linfócito de Pacientes com Doença Falciforme em Uso ou Não de Hidroxiureia. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, n. S2, p. 428-429, nov. 2020.
- ZAHARAN, A. M. *et al.* Effect of Hydroxyurea Treatment on the Inflammatory Markers Among Children With Sickle Cell Disease. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 26, p. 1-7, jan. 2020.
- ZAMARO, P. J. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinas variantes**: Contribuição para o estudo dos defeitos moleculares da hemoglobina humana na população brasileira. São José do Rio Preto, SP: Editora HN, 2010.

ANEXO A – RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSO

Resumo apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular
– HEMO PLAY 2021

Publicado na revista: Hematology, Transfusion and Cell Therapy

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2021;43(S1):S1–S546

S21

EVALUATION OF THE LEUKOCYTE INDEX IN SICKLE CELL ANEMIA WITH THE USE OF HYDROXYUREA

JO Rios, TF Ribeiro, LR Pereira, CRB Domingos, DP Malerba

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São Paulo, SP, Brazil

Objectives: The term sickle cell disease (SCD) is used to describe a group of genetic disorders in which there is a predominance of HbS, a variant hemoglobin originated from a single nucleotide polymorphism (SNP) responsible for the exchange of a glutamic acid by valine in position 6 of β -globin chain. The most severe form of the disease is homozygous (HbSS). Thus, sickle cell disease patients may present different clinical manifestations and inflammatory processes. A pharmacotherapeutic used for the treatment is Hydroxyurea. The action of this drug includes increasing fetal hemoglobin levels and improving clinical severity and hematological parameters. This study aimed to investigate hematological stress in patients with sickle cell anemia treated (or not) with hydroxyurea, and classified regarding the risk of severity by the Calculator of severity of sickle cell disease. **Methodology:** DNA samples from 200 patients with sickle cell anemia, in steady state of the disease, using and not using hydroxyurea, were submitted to molecular analysis to confirm HbSS. Then, chronic stress was characterized from the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) through the analysis of the blood count and clinical history. NLR is an important inflammatory marker, its calculation is indicated for patients with sickle cell disease and values above one may indicate hematological stress. Statistical analyzes were performed using IBM SPSS Statistics 20 software. Data normality was verified using the Shapiro-Wilk test. Assessed for non-normality, the non-parametric Wilcoxon test was performed to compare the means between the leukocyte profile and the use of hydroxyurea. Then, a comparison was made between the risk of death of patients who were (or not) treated with hydroxyurea. The results were shown as mean and standard deviation, with a significance level of 0.05. **Results:** The means and standard deviation were NLR/With HU (1.76 ± 1.53) and NLR/Without HU (1.65 ± 1.07). In order to verify the difference between the means, we used the Wilcoxon test whose value was $p = 0.975$. Thus, we observed that there was no difference between leukocyte stress and the use of Hydroxyurea. When comparing the risk of death of patients which use the drug (1.96 ± 0.73) and those who do not use it (2.22 ± 0.75), we noticed that there were significant differences between the groups ($p = 0.01$). Therefore, the drug can contribute to reduce the risk of death. **Discussion:** The non-relation between leukocyte stress and the use of hydroxyurea reported in this study is not well documented in the literature. However, we observed an increase in NLR in critically ill patients with sickle cell disease classified by the Calculator of severity of sickle cell disease. The role of hydroxyurea in the risk of life for patients with sickle cell anemia is well documented. It is known that it can help reducing the number of hospitalizations, length of stay, less occurrence of acute chest syndrome, lower morbidity and mortality rate, contributing to an increase of up to 40% in patient survival.



Our results corroborate literature data. **Conclusion:** There was no relationship between stress through the NLR and the use of hydroxyurea, but there is a relationship between the severity of the disease and the use of the medication. Relating leukocyte stress with disease severity as well as the impact of hydroxyurea on these indices is important to understand the clinical manifestations of sickle cell anemia patients.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.036>

EXPRESSÃO DE MIR-199A-5P, MIR-144 E MIR-126 CIRCULANTES NA OCORRÊNCIA E RECORRÊNCIA DE ÚLCERA DE PERNA FALCIFORME

EDC Santos^a, GIV Melo^a, BT Correa^a, SCMA Yahouédéhou^b, LCGC Luiz^a, CM Kaneto^a, EV Adorno^c, TCC Fonseca^d, MS Gonçalves^{b,c}, MM Aleluia^a

^a Laboratório de Patologia Aplicada e Genética, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil

^b Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional (LIGHT), Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brasil

^c Laboratório de Pesquisa em Anemias, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

^d Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil

A doença falciforme (DF) constitui um grupo de hemoglobinopatias caracterizado pela produção da hemoglobina S. A fisiopatologia da DF decorre de hemólise intravascular, destruição de hemácias, resultando em vasculopatia e manifestações clínicas, como as úlceras de perna que constituem lesões cutâneas em maléolos de membros inferiores. O advento das técnicas de biologia molecular possibilitou a identificação de microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNAs não-codificantes, que podem apresentar influência direta em diversas patologias, incluindo a DF. Entretanto, o papel de miRNAs na úlcera de perna falciforme ainda não é completamente compreendido. Desta forma, este estudo objetivou avaliar a expressão de três miRNAs (miR-199a-5p, miR-144 e miR-126) circulantes em associação à fisiopatologia da úlcera de perna falciforme. Estudo de corte transversal descritivo realizado no Centro de Referência a Doença Falciforme de Itabuna (CERDOFI), Bahia, no período de julho a novembro de 2019. Todos os pacientes incluídos nessa casuística estavam em estado estável, fora de terapia transfusional. Foram incluídos 65 pacientes com DF, sendo 52 pacientes sem úlcera de perna (UP-) e 13 pacientes com úlcera de perna ativa (UP+). A avaliação clínica das úlceras de perna foi realizada a partir da revisão de prontuários médicos no CERDOFI. Com devida aprovação do comitê de ética e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados 15 mL de sangue periférico. A partir do soro e plasma foi realizada





Perfil genotípico em portadores de Hemoglobina S

Thais Fernandes Ribeiro, Lucas Ramos Pereira, Claudia Regina Bonini Domingos, Câmpus de São José do Rio Preto, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Ciências biológicas, thais.f.ribeiro@unesp.br, Bolsa PIBIC/RT.

Palavras Chave: Doença falciforme, Hemocromatose hereditária, Anemia falciforme.

Introdução

A doença falciforme (DF) é um grupo de afecções genéticas caracterizada por uma mutação pontual com substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 do gene β -globina, alterando a estrutura da hemoglobina, com prevalência da hemoglobina (Hb) variante denominada HbS. E tem como resultado manifestações clínicas variáveis e processos inflamatórios.

A hemocromatose hereditária (HH) está relacionada com a homeostase do ferro celular e pode depender de processos complementares, como a sobrecarga de ferro secundário adquirido na DF¹. Portadores de polimorfismos no gene *HFE* (*C282Y*, *H63D* e *S65C*) podem desenvolver uma série de doenças inflamatórias e neuronais².

Objetivo

Relacionar o genótipo de doença falciforme com o genótipo das mutações no gene *HFE* por meio de análise molecular.

Material e Métodos

Amostras de DNA de 516 pacientes com doença falciforme, em uso e sem uso de Hidroxiuréia, em estado estacionário da doença, foram submetidas à análise molecular para confirmar a doença falciforme e as mutações no gene *HFE*. Foram identificados 235 indivíduos com DF do sexo masculino e 281 do sexo feminino, com idades entre 6 a 65 anos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo software *Statistica 8.0*. A normalidade dos dados foi verificada usando o teste de *Shapiro-Wilk*. Avaliada a não normalidade, o teste não paramétrico de *Qui-Quadrado* foi efetuado para a associação entre os genótipos de anemia falciforme e de HH. Em seguida, foi calculado a frequência alélica entre os heterozigotos e homozigotos das mutações no gene *HFE*. Os resultados foram descritos com nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

O perfil das mutações no gene *HFE* está indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil das mutações no gene *HFE* no genótipo de Hemoglobina

Genótipo de Hb	Perfil de mutações no gene <i>HFE</i>								
	<i>H63D</i>			<i>C282Y</i>			<i>S65C</i>		
	W/W	W/M	M/M	W/W	W/M	M/M	W/W	W/M	M/M
SS	199	212	5	404	12	0	413	3	0
S/beta tal	7	13	0	20	0	0	20	0	0
SC	40	28	0	67	1	0	67	1	0
SD	8	3	1	11	1	0	12	0	0
TOTAL	254	256	6	502	14	0	512	4	0

A comparação pelo teste de *Qui-Quadrado* indicou um valor de $p=0.22$ para o polimorfismo *H63D* e $p=0.20$ para o *C282Y* e o *S65C*. Assim, verificamos que não houve diferenças significativas entre a homozigose e heterozigose de cada polimorfismo na anemia falciforme. A frequência alélica apresentada na Tabela 2 corrobora o equilíbrio entre os alelos do gene *HFE*, apesar da maior frequência encontrada para o polimorfismo *H63D*.

Tabela 2. Frequência alélica no gene *HFE*

Genótipo de Hb		<i>H63D</i>		<i>C282Y</i>		<i>S65C</i>	
		n°	F	n°	F	n°	F
SS	W	610	0.733173	820	0.985577	829	0.996394
	M	222	0.266827	12	0.014423	3	0.003606
TOTAL ALELOS		832	1	832	1	832	1
S/beta tal	W	27	0.675	40	1	40	1
	M	13	0.325	0	0	0	0
TOTAL ALELOS		40	1	40	1	40	1
SC	W	108	0.794118	135	0.992647	135	0.992647
	M	28	0.205882	1	0.007353	1	0.007353
TOTAL ALELOS		136	1	136	1	136	1
SD	W	19	0.791667	23	0.958333	24	1
	M	5	0.208333	1	0.041667	0	0
TOTAL ALELOS		24	1	24	1	24	1

Conclusão

Nossos resultados não mostraram relação do genótipo de doença falciforme com o genótipo no gene *HFE*.

Agradecimentos

Bolsa PIBIC/RT concedida ao primeiro autor.

¹ Thom, C. S.; et al. *Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013, v. 3, p. 1-22.

² Souto, N. L. R.; Pugliesi, P. R.; Lopes, I. C. R.; Huffmann, J. C. J. *Hereditary hemochromatosis: literature review*. Revista Médica de Minas Gerais. 2016, v. 26.

³ Nixon, A. M.; et al. *The role of HFE genotype in macrophage phenotype*. Journal of Neuroinflammation. 2018, v. 15, p. 11.