

GISLENE PEREIRA GIL

Análise de polimorfismos em genes envolvidos no estresse oxidativo e associação com a severidade da doença em pacientes com anemia falciforme

Analysis of polymorphisms in genes involved in oxidative stress and association with the severity of the disease in patients with sickle cell disease

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

GISLENE PEREIRA GIL

Análise de polimorfismos em genes envolvidos no estresse oxidativo e associação com a severidade da doença em pacientes com anemia falciforme

Analysis of polymorphisms in genes involved in oxidative stress and association with the severity of the disease in patients with sickle cell disease

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Dissertation submitted to the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas - UNICAMP for the title of Master of Medicine.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mônica Barbosa de Melo

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Tutor: Associate Professor Mônica Barbosa de Melo

Co-Tutor: Associate Professor Fernando Ferreira Costa

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA GISLENE PEREIRA GIL E ORIENTADA PELA PROF^ª. DR^ª. MÔNICA BARBOSA DE MELO.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Barbosa de Melo", is written over a horizontal line.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G37a Gil, Gislene Pereira, 1985 -
Análise de polimorfismos em genes envolvidos no estresse oxidativo e associação com a severidade da doença em pacientes com anemia falciforme / Gislene Pereira Gil. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Mônica Barbosa de Melo.
Coorientador : Fernando Ferreira Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Heme Oxigenase (Desciclizante). 2. Hemoglobina fetal. 3. Antioxidantes. 4. Índice de gravidade de doença. I. Melo, Mônica Barbosa de. II. Costa, Fernando Ferreira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of polymorphisms in genes involved in oxidative stress and association with the severity of the disease in patients with sickle cell disease.

Palavras-chave em inglês:

Heme oxigenase (desciclizante)

Fetal hemoglobin

Antioxidants

Severity of illness index

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Mônica Barbosa de Melo [Orientador]

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Daniela Sanchez Bassères

Data da defesa: 21/08/2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

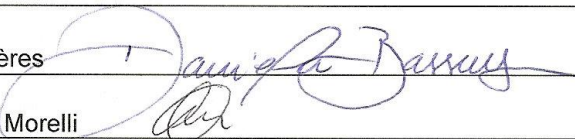
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Gislene Pereira Gil

Orientador: Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo

Membros:

1. Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères



2. Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli



3. Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/08/2012

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por ter me oferecido a oportunidade de viver e evoluir a cada dia.

Aos meus pais, **Roselaine e Roberto**, que sempre me apoiaram em cada etapa da minha vida, exemplos de integridade, humildade e caráter.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a Mônica Barbosa de Melo, pela confiança depositada em meu trabalho, a qual foi de extrema importância para a conclusão deste projeto, pela atenção, paciência, ajuda em todos os momentos e a amizade construída ao longo desses anos.

A minha família pela confiança e apoio incondicional.

Ao meu namorado André, com quem frequentemente compartilhei o meu cansaço, preocupação e os vários momentos de alegria. Agradeço pelo seu apoio, atenção e confiança.

A todas as amigas que dividiram moradia comigo, Lilian, Mariana, Elisa, Paula, pela paciência, ajuda e compreensão. Em especial à Mariana, pela várias conversas nos momentos de crise, pelos conselhos e também pelos puxões de orelha.

Aos amigos de laboratório, Daniela Stancato, Pedro, Bruno, Anderson, Mariana, Galina, Carol, Dani Mineira, Hugo, Eugênio, Fábio, Caique, pelo apoio, atenção e os momentos de descontração.

À Galina, pela enorme paciência em me ajudar e ensinar principalmente na parte das análises estatísticas.

Ao Andrei e à Dulcinéia pela colaboração na parte experimental e ao Magnun pela ajuda em obter os pacientes que participaram do meu trabalho.

Ao Marcos André e ao Dr. Adércio do Hemocentro de Recife – HEMOPE, pela colaboração, a qual foi muito importante para a realização desse projeto.

Às secretarias do CBMEG Sandra, Tânia e Gabriela, as quais sempre foram prestativas e atenciosas com todos.

À Adriana, secretária da pós-graduação da FCM, pelos inúmeros esclarecimentos e ajuda quando precisei.

À CAPES e ao INCT do Sangue pelo importantíssimo apoio financeiro.

RESUMO

Embora a anemia falciforme (AF) resulte da homozigotidade de uma única mutação, no codon 6 do *locus* da β -globina, fenotipicamente, essa doença é muito heterogênea, de modo que diferentes pacientes podem apresentar evoluções clínicas significativamente distintas. As complicações nestes pacientes normalmente são decorrentes de acometimento vascular causado pelo acúmulo de hemácias falcizadas nos vasos sanguíneos. Um dos eventos que vem sendo associados a complicações em diversas doenças é o mecanismo de estresse oxidativo, o qual apresenta-se exacerbado em pacientes com AF. Dentre as fontes de estresse oxidativo nestes pacientes estão os eventos de vaso-oclusão e isquemia reperusão, os quais são muito frequentes. O estresse oxidativo em níveis elevados pode danificar várias moléculas e posteriormente prejudicar o organismo. Alguns polimorfismos em enzimas envolvidas na via de estresse oxidativo foram associados com doenças vasculares como, hipertensão, doença arterial coronária, doença arterial periférica. Considerando que os pacientes com AF apresentam complicações decorrentes de acometimento vascular, esses polimorfismos podem estar contribuindo para as várias manifestações clínicas e, conseqüentemente, para a gravidade da doença. Este projeto se propôs a avaliar três polimorfismos em genes envolvidos no mecanismo de estresse oxidativo em pacientes com AF e testar a associação com o grau de gravidade da doença. Os polimorfismos analisados foram o C242T e -930 A/G no gene *CYBA* e o -413 T/A no gene *HMOX-1*. Os genótipos foram identificados por meio das técnicas de PCR e sequenciamento direto, e os escores de gravidade foram obtidos através de índices de severidade, em 169 pacientes. O genótipo AA do polimorfismo -930 A/G apresentou-se associado com escores baixos de gravidade, obtidos através do índice pediátrico, nas crianças com anemia falciforme. O genótipo CT do polimorfismo C242T esteve associado com crises algicas e o genótipo TT do polimorfismo -413 T/A mostrou-se associado a níveis elevados de HbF, através de análises dos dados de todos os pacientes. De acordo com este estudo, sugerimos novos marcadores genéticos, os quais podem estar direta ou indiretamente envolvidos com a gravidade da doença em pacientes com AF na população brasileira. Estudos futuros em grandes coortes necessitam ser realizados para confirmar esses resultados.

ABSTRACT

Although sickle cell anemia (SCA) results from the homozygosity for a single mutation at codon 6 of the β -globin locus, phenotypically this disease is very heterogeneous, so that different patients may have significantly different clinical outcomes. The complications in these patients are usually caused by vascular impairment caused by the accumulation of sickled erythrocytes in the blood vessels. One event that has been associated with complications in several diseases is oxidative stress, which has increased levels in SCA patients. Among the sources of oxidative stress in these patients are the vaso-occlusion and ischemia reperfusion events, which are very common. Oxidative stress at high levels can damage various molecules and subsequently damage the organism. Some polymorphisms of enzymes involved in the oxidative stress pathway have been associated with vascular diseases as: hypertension, coronary heart disease, peripheral arterial disease. Considering that the complications in SCA patients are due to vascular involvement, these polymorphisms may be contributing to the various clinical manifestations and consequently to the severity of the disease. This project proposes to evaluate three polymorphisms in genes involved in the mechanism of oxidative stress in SCA patients and test the association with the severity of the disease. The analyzed polymorphisms were C242T and -930 A/G in the *CYBA* gene and the -413 T/A in the *HMOX-1* gene. The genotypes were identified through PCR and direct sequencing, and severity scores were obtained by severity indexes in 169 patients. The AA genotype of the -930 A/G polymorphism was associated with low severity scores, obtained from the pediatric index, in children with sickle cell anemia. The CT genotype of the C242T polymorphism was associated with pain crisis and the TT genotype of the -413 T/A polymorphism was associated with high levels of HbF, after analyzing the data from all patients. According to this study, new genetic markers can be suggested, which may be, directly or indirectly, involved with disease severity in patients with SCA in the Brazilian population. Future studies in larger cohorts have to be conducted to confirm these results.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AF	anemia falciforme
AS	heterozigoto para anemia falciforme
β	beta
β^S	gene da beta globina com a mutação para anemia falciforme
CYBA	gene “Cytochrome b-245, alpha polypeptide”
D	direto
dbSNP	banco de dados de SNP “ single nucleotide polymorphism database”
dL	decilitro
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	didesoxinucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
fL	fentolitros (unidade de medida de volume igual a 10^{-15} litro)
g	grama
H₂O	fórmula da água
HbA	hemoglobina Adulta tipo 1
HbA₂	hemoglobina Adulta tipo 2
HbAS	hemoglobina AS
HbF	hemoglobina Fetal
HbS	hemoglobina S
HCl	ácido clorídrico
HMOX-1	gene codificador da enzima heme oxigenase isoforma 1
HO	enzima heme oxigenase
HO-1	enzima heme oxigenase isoforma 1

KCl	cloreto de potássio
L	litro
LDH	“lactate dehydrogenase”
M	molar
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
ng	nanograma
OMIM	“Online Mendelian Inheritance in Man”
pb	pares de bases
PCR	“polymerase chain reaction”
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
q.s.p.	quantidade suficiente para
R	reverso
ROS	“reactive oxygen species”
rpm	rotações por minuto
rs	“assigned reference SNP”
RSB	“reaction stop buffer”
SDS	“sodium dodecyl sulfate”
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA

TE	tampão de eluição (Tris/EDTA)
U	unidades
μg	micrograma
μL	microlitro
v:v	relação volume por volume
VCM	volume corpuscular médio
WBC	“white blood cell”
γ	gama
°C	graus centígrados

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados como “primers” (Direto e Reverso) na amplificação (PCR) dos genes <i>CYBA</i> e <i>HMOX-1</i> , tamanhos dos fragmentos (pb) e temperatura de anelamento (°C).....	47
Tabela 2. Atribuição da pontuação aos dados clínicos e laboratoriais, através do índice pediátrico.	51
Tabela 3. Frequências genótípicas e alélicas dos três polimorfismos estudados: C242T, -913 A/G e -413 T/A em todos os pacientes com anemia falciforme (n=169).	56
Tabela 4. Grupos de genótipos testados e as médias dos escores relacionados a eles, sendo esses escores obtidos através do índice geral em todos os 169 pacientes.	59
Tabela 5. Grupos de genótipos testados e as médias dos escores relacionados a eles, sendo esses escores obtidos através do índice pediátrico nos 101 pacientes pediátricos.	61
Tabela 6. Frequências das variáveis clínicas obtidas nos 169 pacientes com anemia falciforme.....	62
Tabela 7. Média e desvio padrão das variáveis laboratoriais obtidas nos 169 pacientes com anemia falciforme	63
Tabela 8. Resultados dos p-valores obtidos através dos testes de associação entre as variáveis, clínicas e laboratoriais, e os genótipos dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A.	64
Tabela 9. Frequências genótípicas e alélicas dos três polimorfismos estudados: C242T, -930 A/G e -413 T/A nos 111 indivíduos negros saudáveis.	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Molécula de hemoglobina e suas quatro subunidades, sendo duas delas α e duas delas β com seus respectivos grupos heme ao centro.....19
- Figura 2.** Em A, está representado o *cluster* do gene da α -globina localizado no braço curto do cromossomo 16. Em B, está representado o *cluster* do gene da β -globina localizado no braço curto do cromossomo 11.....20
- Figura 3.** Em A, está representado o início da região codificante do gene da beta globina, onde o sexto códon irá codificar o aminoácido ácido glutâmico, gerando hemácias normais. Em B, está representado o início da região codificante na qual se observa a troca da base A pela base T no sexto códon. Devido a esta troca, este códon irá codificar o aminoácido valina e hemácias falcêmicas serão geradas (modificado de <http://www.mdsaude.com/2008/12/anemia-falciforme-drepanoctica-e-trao.html>).....22
- Figura 4.** Em A, está a representação das hemácias normais quando desoxigenadas e a sua circulação normal dentro dos vasos sanguíneos. Em B, está a representação das hemácias com hemoglobinas mutadas. Quando desoxigenadas essas hemácias tendem a adquirir um formato típico de foice, apresentando pouca elasticidade e com dificuldade para atravessar vasos pequenos e bifurcações. Essa falta de maleabilidade leva as hemácias a ficarem presas em regiões do vaso, causando obstrução do fluxo sanguíneo (modificado <http://www.mdsaude.com/2008/12/anemia-falciforme-drepanoctica-e-trao.html>).23
- Figura 5.** Lócus do gene da β -globina contendo polimorfismos, representados em azul , onde de acordo com a presença ou ausência destes polimorfismos é determinado o haplótipo do paciente. Os haplótipos podem ser Benin, CAR, Senegal e Árabe.....27
- Figura 6.** Representação da enzima antioxidante NADPH oxidase e suas subunidades e o processo de produção de radicais livres, a partir da transferência de elétrons à molécula de O_2 gerando o superóxido que contribui para o estresse oxidativo no organismo..34
- Figura 7.** Representação do gene *CYBA* e a localização dos polimorfismos -930 A/G e C242T (Adaptado de Zalba *et al.*, 2009).....35

Figura 8. Representação da função da enzima HO. Esta enzima se liga ao grupo heme livre reativo, liberando uma molécula de ferro e uma molécula de CO, produzindo a biliverdina que em seguida é convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase.....	38
Figura 9. Em A, está representada a sequencia do gene <i>CYBA</i> , onde a seta está indicando a posição do polimorfismo C242T, o qual se apresenta em heterozigose. Em B, está representada a mesma sequencia vista em A, porém contendo o alelo selvagem C para o mesmo polimorfismo.....	54
Figura 10. Em A, está representada a sequencia do gene <i>CYBA</i> , onde o polimorfismo -930 A/G está indicado através da seta, o qual se apresenta em heterozigose. Em B, está representada a mesma sequencia do gene <i>CYBA</i> , porém contendo o alelo selvagem A para o mesmo polimorfismo.....	55
Figura 11. Em A, está representada a sequencia do gene <i>HMOX-1</i> , de modo que a seta está indicando o polimorfismo -413 T/A, o qual se apresenta em heterozigose. Em B, está representada a mesma sequencia vista em A, porém contendo o alelo selvagem T para o polimorfismo -413 T/A.....	55
Figura 12. Distribuição dos escores entre os genótipos dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A, obtidos através do índice geral para os 169 pacientes. A mediana está representada abaixo de cada um dos genótipos.....	57
Figura 13. Distribuição dos escores entre os genótipos dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A, obtidos através do índice pediátrico nas crianças com anemia falciforme. A mediana está representada abaixo de cada um dos genótipos.....	60
Figura 14. Frequência da variável crises álgicas nos três genótipos do polimorfismo C242T do gene <i>CYBA</i> . Os eventos de crises álgicas mostrou-se mais frequente em pacientes com o genótipo CT.	65
Figura 15. Distribuição da variável HbF entre os genótipos do polimorfismo- 413 T/A do gene <i>HMOX-1</i> , onde é possível observar que os níveis de HbF estão mais elevados na presença do genótipo TT do polimorfismo -413 T/A.	66

Sumário

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Hemoglobinas.....	19
1.2. Anemia falciforme - Fisiopatologia e bases moleculares.....	21
1.3. Prevalência	24
1.4. Diagnóstico laboratorial.....	25
1.5. Modulação genética da diversidade fenotípica da anemia falciforme.....	26
1.6. Quadro clínico.....	27
1.7. Anemia falciforme e os índices de gravidade	29
1.8. Anemia falciforme e o estresse oxidativo.....	30
1.9. Os radicais livres.....	32
1.10. O sistema vascular e dano oxidativo: O complexo NADPH.....	33
1.10.1. Polimorfismos na subunidade <i>p22phox</i>	35
1.11. Antioxidantes	37
1.12. O sistema vascular e dano oxidativo: Heme Oxigenase - HO.....	37
1.12.1. Polimorfismos no gene <i>HMOX-1</i>	39
1.13. Justificativa	40
2. OBJETIVO	42
3.1. Casuística.....	44
3.1.1. Critérios de inclusão	44
3.1.2. Critérios de exclusão	45
3.1.3. Amostra da população do Estado de Pernambuco.....	45
3.2. Métodos	45

3.2.1. Coleta dos dados clínicos e laboratoriais	45
3.2.2. Coleta de amostras de sangue periférico	46
3.2.3. Extração de DNA genômico	46
3.2.5. Reação de sequenciamento	48
3.2.6. Escore para o grau de severidade	49
3.2.7. Análise estatística	51
4. RESULTADOS	54
4.1. Identificação dos genótipos para os polimorfismos C242T -930 A/G e -413 T/A.	54
4.2. Atribuição dos escores	56
4.3. Análises a partir do índice geral em todos os pacientes	57
4.3.1. Distribuição dos escores entre os genótipos	57
4.3.2. Análises pelo teste estatístico Kruskal-Wallis	58
4.3.3. Análises pelo teste estatístico Mann-Whitney	58
4.4. Análises a partir do índice pediátrico	59
4.4.1. Distribuição dos escores entre os genótipos	59
4.3.3. Análises pelo teste estatístico kruskal-Wallis	60
4.3.4. Análises pelo teste estatístico Mann-Whitney	60
4.4. Análises das variáveis clínicas e laboratoriais	62
4.5. Indivíduos negros saudáveis	67
5. DISCUSSÃO	69
5.1. Índice geral	69
5.2. Índice pediátrico	70
5.3. Análises das variáveis clínicas e laboratoriais	72
5.3.1 Crises algicas	72
5.3.2. Níveis de Hemoglobina Fetal (HbF)	73
5.4. Indivíduos negros saudáveis	74
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ANEXOS 85

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hemoglobinas

A molécula da hemoglobina é uma proteína globular composta por quatro cadeias globínicas associadas a grupos heme, como demonstrado na figura 1. As hemoglobinas são encontradas nas hemácias, cuja principal função é o transporte de O_2 aos tecidos.

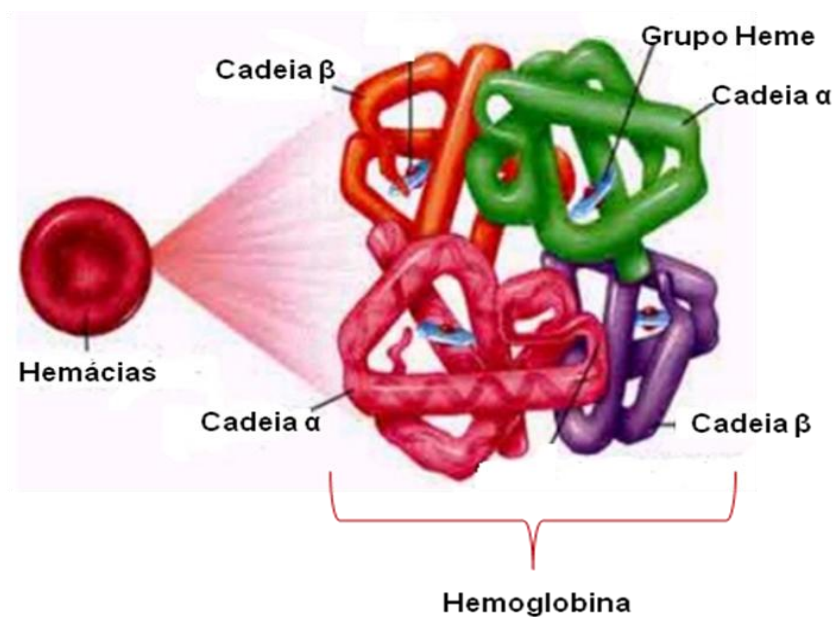


Figura 1. Molécula de hemoglobina e suas quatro subunidades, sendo duas delas α e duas delas β com seus respectivos grupos heme ao centro.

As subunidades desta molécula são codificadas por um pequeno grupo de genes (α e β) que são expressos sequencialmente durante o desenvolvimento. Os genes do *cluster* α estão agrupados no braço curto do cromossomo 16, enquanto os genes do *cluster* β estão agrupados no braço curto do cromossomo 11 (Antonarakisa et al., 1985). O *cluster* dos genes α e β estão demonstrados na figura 2.

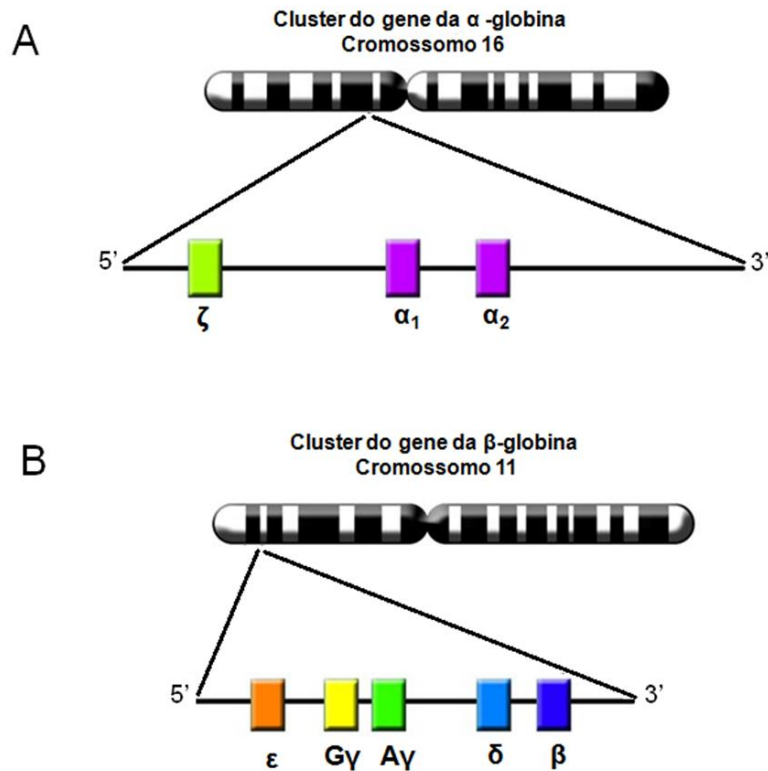


Figura 2. Em A, está representado o *cluster* do gene da α -globina localizado no braço curto do cromossomo 16. Em B, está representado o *cluster* do gene da β -globina localizado no braço curto do cromossomo 11.

Para cada estágio do desenvolvimento humano há a produção de hemoglobinas específicas e estas estão listadas abaixo.

Embrionária:

- Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$)
- Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$)
- Hemoglobina de Portland ($\zeta_2\gamma_2$)

Fetal:

- Hemoglobina F ($\alpha_2\gamma_2$)

Adultos:

- Hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$)

- Hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$)

Nos estágios embrionários iniciais, o tetrâmero da hemoglobina Gower 1 consiste de duas cadeias ϵ (cluster β) e duas ζ (cluster α). Aproximadamente no início da oitava semana de gestação, as cadeias produzidas são gradualmente substituídas pela cadeia α adulta e duas diferentes cadeias fetais, designadas $G\gamma$ e $A\gamma$. Durante o período de transição entre os estágios embrionário e fetal, as hemoglobinas Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) são detectadas. A HbF ($\alpha_2\gamma_2$) torna-se a hemoglobina predominante ao longo do período fetal restante. Após o nascimento, as cadeias γ gradualmente são substituídas pelas cadeias β e δ . Por volta do sexto mês após o nascimento 97%-98% das hemoglobinas são formadas pelo tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (HbA), enquanto a HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) está presente em aproximadamente 2% a 3%. Pequenas quantidades de HbF são também encontradas no sangue adulto (Maniatis et al., 1980).

1.2. Anemia falciforme - Fisiopatologia e bases moleculares.

A anemia falciforme foi relatada pela primeira vez por Herrick, em 1910, o qual observou células em forma de “foice” no sangue de um estudante negro que apresentava anemia severa. Esta afecção é decorrente da substituição de uma adenina por uma timina (GAG→GTG) no sexto códon do gene da β -globina localizado no cromossomo 11, o que resulta na troca do aminoácido ácido glutâmico por valina, levando à polimerização das moléculas da hemoglobina anormal (hemoglobinas S ou HbS) quando desoxigenadas (Frenette et al., 2007). Na figura 3 está a representação de uma fita de DNA da região codificante do gene da beta globina sem apresentar alteração e outra fita da mesma região apresentando a mutação da base A pela base T no sexto códon, modificando o aminoácido para valina e, por consequência, levando à formação das hemácias falcêmicas.

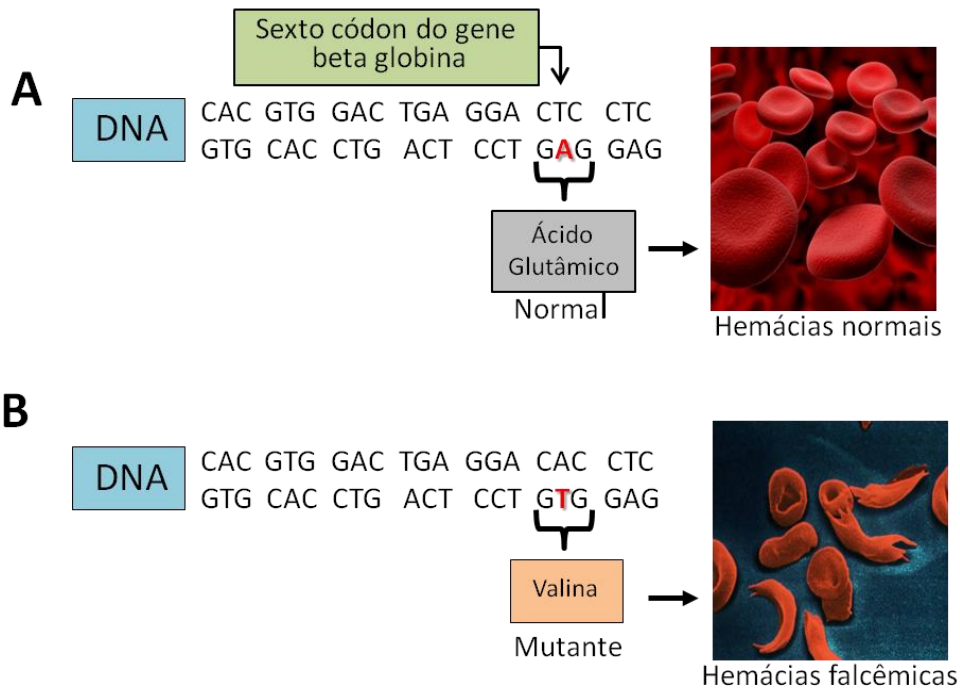


Figura 3. Em A, está representado o início da região codificante do gene da beta globina, onde o sexto códon irá codificar o aminoácido ácido glutâmico, gerando hemácias normais. Em B, está representado o início da região codificante na qual se observa a troca da base A pela base T no sexto códon. Devido a esta troca, este códon irá codificar o aminoácido valina e hemácias falcêmicas serão geradas (modificado de <http://www.mdsaude.com/2008/12/anemia-falciforme-drepanocitica-e-trao.html>).

A anemia falciforme é resultante da homozigose do gene β^S (genótipo SS), correspondendo à forma mais grave das síndromes falciformes. Ocorre o predomínio da produção de HbS, ausência de hemoglobina A (HbA), acompanhada de quantidades normais de hemoglobina A₂ (HbA₂) e aumento moderado de hemoglobina fetal (HbF). Quando o gene β^S aparece em heterozigose (traço falciforme, genótipo AS), não são observadas anormalidades hematológicas nos portadores. A morfologia eritrocitária, o nível de hemoglobina, assim como os números de leucócitos e plaquetas são normais.

A hemoglobina S quando desoxigenada *in vitro* sob condições próximas às fisiológicas, torna-se relativamente insolúvel e agrega-se em longos polímeros, os quais resultam do alinhamento de moléculas de hemoglobina S unidas por ligações não

covalentes (Steinberg, 1998). Na figura 4 estão representadas as hemácias normais e falcêmicas dentro dos vasos sanguíneos quando desoxigenadas. As hemácias falcêmicas tendem a perder sua elasticidade, levando à obstrução dos vasos sanguíneos principalmente na microcirculação.

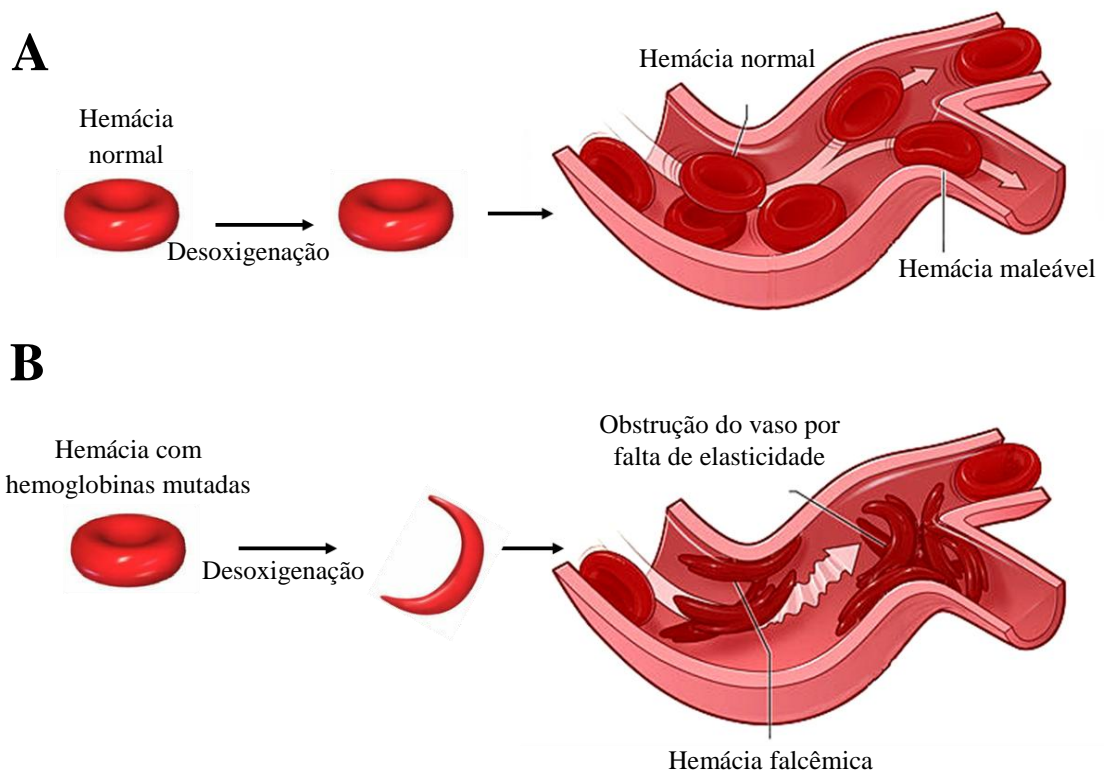


Figura 4. Em A, está a representação das hemácias normais quando desoxigenadas e a sua circulação normal dentro dos vasos sanguíneos. Em B, está a representação das hemácias com hemoglobinas mutadas. Quando desoxigenadas essas hemácias tendem a adquirir um formato típico de foice, apresentando pouca elasticidade e com dificuldade para atravessar vasos pequenos e bifurcações. Essa falta de maleabilidade leva as hemácias a ficarem presas em regiões do vaso, causando obstrução do fluxo sanguíneo (modificado <http://www.mdsaude.com/2008/12/anemia-falciforme-drepanocitica-e-trao.html>).

Somente a forma desoxigenada de hemoglobina S é passível de polimerização, sendo este o principal evento na patogenia da anemia falciforme, resultando na alteração da forma do eritrócito e na acentuada redução de sua deformabilidade. As células rígidas com formas alteradas classicamente conhecidas como células em forma de foice são responsáveis pela oclusão vascular e lesão de tecidos que representam os fenômenos principais dessa doença (Steinberg, 1998; Bunn, 1997).

O fenômeno de “falcização” pode ser reversível após a reoxigenação. Contudo, a repetição desse fenômeno pode causar lesões de membrana em algumas células suscetíveis, fazendo com que a rigidez e configuração em forma de foice persistam mesmo após a reoxigenação. Esses eritrócitos denominados “células irreversivelmente falcizadas” permanecem com a forma anormal mesmo na ausência de polimerização intracelular da hemoglobina. As células irreversivelmente falcizadas em decorrência de sua acentuada rigidez têm diminuição de sua vida média, contribuindo para a anemia hemolítica dos pacientes eritrofalcêmicos. O quadro clínico da anemia falciforme depende substancialmente da ocorrência de lesões orgânicas causadas pela obstrução vascular e das chamadas “crises de falcização”. Em geral, a vaso-oclusão na anemia falciforme ocorre na microcirculação, podendo contudo, afetar grandes artérias principalmente nos pulmões e no cérebro (Bunn, 1997).

1.3. Prevalência

A maior prevalência da anemia falciforme ocorre na raça negra, sendo sua maior incidência na África, embora seja também encontrada em países Mediterrâneos, principalmente na Grécia, Itália, Israel, Arábia Saudita, Índia e nos negros americanos. Nos Estados Unidos a forma heterozigota também conhecida como traço falciforme,

afeta aproximadamente 8% da população de raça negra e o número de recém-nascidos portadores da forma homozigota está estimada em 1/625. No Brasil as frequências variam de 5 a 10% de heterozigotos AS em descendentes de africanos, sendo que no Estado de São Paulo esta frequência é pouco menor que 2% (Salzano, 1985; Paixão, 2001). A estimativa é de que somente no Brasil haja aproximadamente 2 milhões de heterozigotos AS (Steinberg, 1998).

1.4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da anemia falciforme é feito através de eletroforese de hemoglobina, focalização isoelétrica ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As cadeias β globínicas são detectáveis em fase precoce da vida fetal, a partir da 10^a a 12^a semana de gravidez, o que possibilitaria o diagnóstico pré-natal da anemia falciforme (Serjeant, 1999).

Os clássicos dados laboratoriais de hemólise são observados: elevação de bilirrubina indireta, redução de haptoglobina, elevação de urobilinogênio urinário e hiperplasia eritróide na medula óssea. A leucocitose, alteração nem sempre relacionada com processo infeccioso, pode ser observada mesmo na fase estável. A contagem de plaquetas está em geral elevada, podendo atingir até 1.000.000/ μ l. As provas de coagulação são em geral normais durante a fase estável, mas durante os episódios vaso-oclusivos alguns testes podem apresentar alterações características de hipercoagulabilidade (Steinberg, 1998; Bunn, 1997; Platt et al., 1994).

1.5. Modulação genética da diversidade fenotípica da anemia falciforme

Embora a anemia falciforme resulte da homozigosidade de uma única mutação, na posição 6 do locus da β -globina, fenotipicamente, essa doença é muito heterogênea, de modo que diferentes pacientes podem apresentar evoluções clínicas significativamente distintas. Dentre os moduladores conhecidos há a HbF (Platt et al., 1994), esta por não conter a cadeia da β -globina em sua composição inibi a polimerização das Hemoglobinas S quando desoxigenadas, impedindo o fenômeno de falcização. Outros possíveis moduladores desta variabilidade fenotípica são os haplótipos do gene da β -globina, a região controladora da expressão do complexo do gene da β -globina (LCR – *Locus control region*), mutações que causam persistência hereditária de hemoglobina fetal e alfa-talassemia (Platt et al., 1994; Ohene-Frempong et al., 1998; Sarnaik & Ballas, 2001; Sebastiani et al., 2005).

Com relação aos haplótipos do gene da β -globina, estes são definidos por polimorfismos do DNA em *cis* ligados ao complexo deste gene como representado na figura 5. A denominação dos haplótipos foi derivada da região geográfica onde cada haplótipo apresentou sua prevalência mais elevada, sendo eles: Benin, CAR, Senegal e Árabe-Indiano. Os haplótipos podem ser utilizados como marcadores de características genéticas em *cis*, herdadas juntamente com o gene β^S , podendo influenciar a expressão dos genes γ -globina, e conseqüentemente, os níveis de HbF. Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano estão associados a níveis elevados de HbF, enquanto que Benin e CAR a níveis menores de HbF. No Brasil, os haplótipos predominantes são Benin e CAR (Steinberg, 1998; Bunn, 1997).

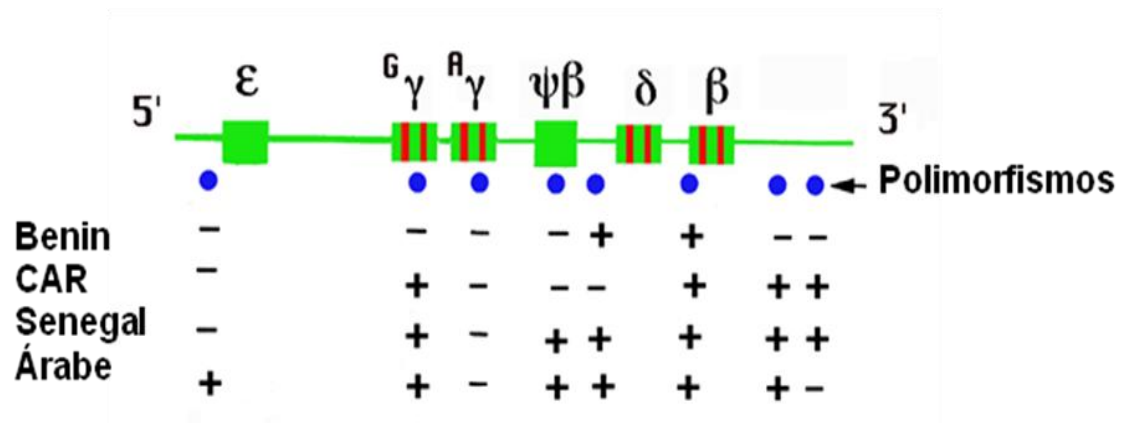


Figura 5. Locus do gene da β-globina contendo polimorfismos, representados em azul, onde de acordo com a presença ou ausência destes polimorfismos é determinado o haplótipo do paciente. Os haplótipos podem ser Benin, CAR, Senegal e Árabe.

É frequente a associação entre anemia falciforme e alfa-talassemia, sendo que em negros, ela deriva quase exclusivamente da deleção de um dos genes da globina alfa. No Brasil, cerca de 20% dos negros são heterozigotos para alfa-talassemia. As consequências dessa associação são: redução do volume corpuscular médio (VCM), menor número de reticulócitos, menor grau de hemólise e maior concentração de hemoglobina, quando comparado com pacientes apresentando genótipo normal para os genes da globina alfa. Aparentemente, úlceras de perna, acidente vascular cerebral e anormalidades da retina são menos frequentes em pacientes com anemia falciforme associada à alfa-talassemia (Steinberg, 1998).

1.6. Quadro clínico

O quadro clínico nas doenças falciformes é variável e derivado, primariamente, da oclusão vascular e, em menor grau da anemia. Praticamente todos os órgãos podem ser afetados pela oclusão vascular. Geralmente os eventos clínicos ocorrem após os seis

meses de vida, pois antes desta idade a alta concentração de HbF é capaz de inibir a falcização (Bunn & Forget, 1986). O curso clínico da anemia falciforme é bem diversificado, podendo apresentar desde crises temporárias leves de dor ou até mesmo crises graves, levando ao risco de vida (Odenheimer, 1983).

As manifestações clínicas observadas nos pacientes com doença falciforme incluem:

- **Anemia crônica:** geralmente é moderada não sendo uma fonte principal de morbidade. Entretanto, a presença de uma infecção viral, tal como infecção por Parvovírus B19, pode causar maior gravidade levando ao risco de vida.
- **Crise óssea:** provém da isquemia aguda ou infarto da medula óssea, acometendo mais comumente os ossos longos das extremidades (úmero, fêmur, tíbia), coluna vertebral e arcos costais.
- **Crise algica:** caracterizada como crise de dor, geralmente, devido a episódios de vaso-oclusão, que ocorrem devido à obstrução dos vasos sanguíneos pelas células falciformes, ocluindo os capilares causando infartos e disfunção dos órgãos acometidos.
- **Crise abdominal:** caracterizada por dor abdominal difusa de início súbito, associada à distensão e sinais de irritação peritoneal.
- **Crise hepática:** tipo de crise abdominal, decorrente da obstrução dos sinusóides hepáticos, levando a uma hepatite isquêmica aguda.
- **Síndrome torácica aguda:** caracterizada pelo aparecimento de um infiltrado pulmonar radiológico recente com sintomas respiratórios e dor torácica. A gênese é multifatorial, predominando a infecção pulmonar na criança e o infarto

pulmonar no adulto. Um dos agentes infecciosos mais comuns é o *S. Pneumoniae*.

- **Acidente vascular cerebral:** uma das complicações mais sérias da anemia falciforme. As lesões neurológicas podem resultar em déficit mental, frequentemente hemiplegia, afasia e paralisia de nervos cranianos.
- **Priapismo:** definido como uma ereção prolongada e bastante dolorida; se não tratado corretamente está associado à impotência. É decorrente do afoijamento de hemácias obstruindo os sinusóides do corpo cavernoso.
- **Sequestro esplênico:** ocorre por um fenômeno vaso-oclusivo nos sinusóides esplênicos, dificultando a drenagem venosa do baço. O baço aumenta agudamente de tamanho, provocando anemia grave, muitas vezes caracterizada como a primeira manifestação clínica da anemia falciforme.
- **Retinopatia falciforme:** provém da obstrução das arteríolas retinianas, levando ao processo isquêmico e à perda visual do paciente.
- **Úlceras de perna:** frequentes em pacientes falcêmicos dos países de clima tropical. As úlceras são decorrentes da isquemia crônica da pele e subcutâneo e podem sofrer infecção bacteriana secundária, dificultando a sua cicatrização (Bunn & Forget, 1986).

1.7. Anemia falciforme e os índices de gravidade

Pelo fato dos pacientes com anemia falciforme apresentarem graus de severidade muito variados, alguns índices foram publicados, na tentativa de identificar os pacientes mais graves, como o índice proposto por Sebastiani et al. (2007) (índice geral), o qual através de uma série de informações clínicas e laboratoriais de cada paciente permite que se estime a chance de morte em até 5 anos. Os escores deste índice variam de 0 a 1,

sendo que, quanto mais próximo de 1, maior a chance de morte do paciente em cerca de 5 anos. Outro índice publicado por Xandra et al. (2010) é um índice pediátrico, o qual atribui um escore as crianças com anemia falciforme, de acordo com a gravidade do paciente, através de dados clínicos e laboratoriais. Os escores deste índice variam de 0 a 270, onde pacientes com valores próximos de 270 apresentam maior gravidade da doença.

1.8. Anemia falciforme e o estresse oxidativo

Há alguns anos a via de estresse oxidativo vem ganhando bastante atenção por revelar-se associada a diversas doenças como o câncer (Freeman & Crapo, 1982), a porfiria intermitente aguda (Hermes-Lima et al., 1991), processos inflamatórios (Flohé et al., 1985), neurodegenerativos (Cohen, 1985) e a vários tipos de doenças cardiovasculares (Dhalla et al., 2000; Gizi et al, 2011). Outra doença, na qual o estresse oxidativo também foi considerado um importante fator patogênico, é a anemia de Fanconi, uma desordem genética que afeta principalmente a medula óssea, gerando uma redução na produção de todos os tipos de células sanguíneas do organismo (Wei et al., 2008).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade de defesa antioxidante (Sies, 1986). Este encontra-se bastante elevado em pacientes com anemia falciforme, provavelmente, devido à grande geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante alguns eventos como as lesões de isquemia reperfusão e eventos vaso-oclusivos. O estresse oxidativo gerado por esses eventos juntamente com a instabilidade das hemácias falcêmicas geram grande atividade do mecanismo de hemólise. O aumento da hemólise pode causar sérios danos ao organismo uma vez que, ao ocorrer o processo de hemólise o grupo heme presente na

hemoglobina é liberado e o heme livre torna-se reativo podendo reagir e danificar outras moléculas (Vercellotti et al., 1994; Jeney et al., 2002).

Para confirmar a hipótese do aumento do nível de estresse oxidativo em pacientes com anemia falciforme Repka et al. (1991) observaram níveis elevados de biomarcadores de estresse oxidativo nestes pacientes, e em estudos complementares constataram que as complicações observadas na anemia falciforme eram resultantes do estresse oxidativo elevado nas hemácias, leucócitos, células endoteliais (Dhalla et al., 2000; Repka et al., 1991; Klings & Farber, 2001; Morris et al., 2008), e plaquetas (Tomer et al., 2001; Ataga & Orringer, 2003). Outros estudos revelaram que as células falciformes geram aproximadamente duas vezes mais ROS do que a Hemoglobina A (Chirico and Pialoux, 2012).

O estresse oxidativo das hemácias falcêmicas muitas vezes é decorrente de produções elevadas de ROS durante a desoxigenação da HbS nos tecidos (Lux et al., 1976) esse aumento na produção de ROS contribui fortemente para a instabilidade destas hemácias falcêmicas, e conseqüentemente, à maior taxa de hemólise no organismo (Klings & Farber, 2001).

Os danos gerados pelo estresse oxidativo ocorrem particularmente durante crises vaso-oclusivas e crises torácicas agudas em consequência da alta produção de ROS (Klings & Farber, 2001; Robert et al., 1982). Além destes eventos, os pacientes falcêmicos apresentam também a geração de ROS em episódios de isquemia reperfusão que é definida como danos causados aos tecidos quando o sangue retorna para o tecido depois de um período de isquemia. A ausência de oxigênio e nutrientes do sangue cria uma condição na qual o restabelecimento da circulação resulta na inflamação e no dano oxidativo ao invés de restauração da função normal (Kaul & Hebbel, 2000;

Osarogiagbon et al., 2000). Esses danos oxidativos gerados tanto pela vaso-oclusão quanto pela isquemia reperfusão levam a uma resposta inflamatória (Carden & Granger, 2000). A inflamação associada com adesão de leucócitos no endotélio vascular e subsequentes lesões endoteliais vasculares parecem contribuir para a patogênese da anemia falciforme (Kaul & Hebbel, 2000; Osarogiagbon et al., 2000; Hebbel, 1997; Belcher et al., 2000; Belcher et al., 2003), podendo causar inúmeras complicações tais como necrose avascular de ossos, infarto retiniano, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar e úlcera de pele (Serjeant, 1992).

1.9. Os radicais livres

O oxigênio é extremamente importante para a produção eficiente de energia em todos os organismos aeróbicos. Entretanto, devido a sua estrutura eletrônica, podem ser formados radicais livres durante a redução parcial desta molécula, que é altamente oxidante (Halliwell & Gutteridge, 1991; Pardini, 1995). Os radicais livres são espécies capazes de existir independentemente e contêm um ou mais elétrons desemparelhados. Deste modo, esta característica confere uma alta reatividade aos mesmos. Entre as formas de radicais livres estão o radical orgânico triclorometil (CCl_3^\cdot), o óxido nítrico (NO^\cdot) e as ROS (Halliwell, 1993).

O termo ROS está relacionado não somente aos radicais livres derivados de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^\cdot) e o radical hidroxil ($^*\text{OH}$), mas também com as moléculas não radicalares de alta reatividade como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (O_2) e o ozônio (O_3) (Maines, 1997).

As ROS reagem com vários componentes celulares, sendo altamente tóxicos. A oxidação pode ocorrer em várias biomoléculas, como aminoácidos, alterando a

atividade enzimática ou a conformação de proteínas; nos ácidos nucleicos, causando mutações (Otterbein et al., 2003); clivando ligações peptídicas (Davies, 1987) e, principalmente atuando na peroxidação dos lipídeos, que são altamente tóxicos à célula (Esterbauer, 1986) e acabam por modificar a membrana celular (Richter, 1987), desta forma desencadeando o processo de hemólise celular.

As ROS são produtos normais do metabolismo celular, necessários para a função normal da célula. No entanto, a superprodução de ROS é prejudicial ao organismo. As ROS podem ser produzidas através da respiração mitocondrial ou a partir de várias oxidases, incluindo NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase (XO), ciclo oxigenase (COX), e lipoxigenase. O corpo humano contém múltiplos sistemas antioxidantes naturais para remoção de ROS prejudiciais (Afonso et al, 2007).

1.10. O sistema vascular e dano oxidativo: O complexo NADPH

A enzima pró-oxidante Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (NADPH oxidase) é uma das principais fontes de ROS no sistema vascular, sendo representada na figura 6. Este complexo transfere elétrons para a molécula de oxigênio produzindo o superóxido, que representa um dos radicais livres que contribui para o estresse oxidativo (Griendling et al., 2000).

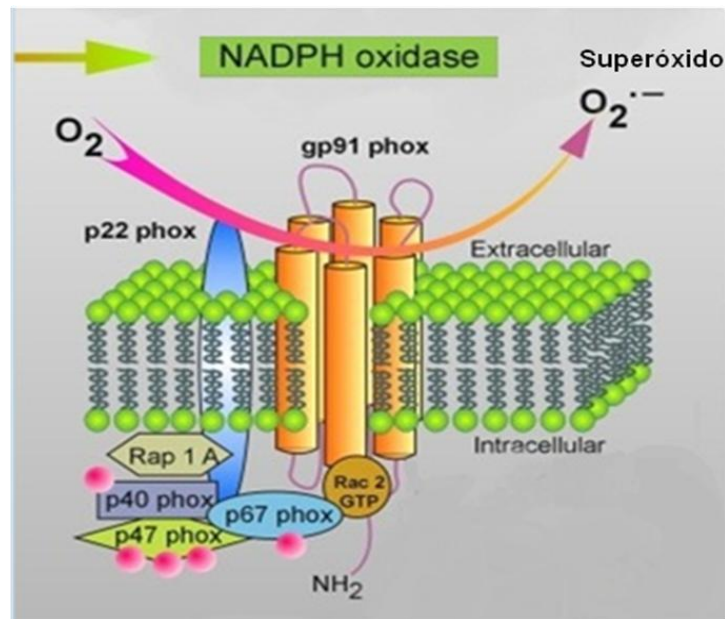


Figura 6. Representação da enzima antioxidante NADPH oxidase e suas subunidades e o processo de produção de radicais livres, a partir da transferência de elétrons à molécula de O_2 gerando o superóxido que contribui para o estresse oxidativo no organismo.

A NADPH é um complexo de enzimas que foi primeiramente descrito em membrana celular de leucócitos fagocíticos, caracterizado como NADPH oxidase fagocítica (Verhoeven et al., 1991), e em seguida, em células da parede dos vasos sanguíneos (células endoteliais, células do músculo liso e fibroblastos), caracterizada como NADPH oxidase vascular (Griendling et al., 2000). O complexo NADPH é constituído por várias subunidades, duas delas associadas à membrana, uma de tamanho maior denominada *gp91phox*, e outra de tamanho menor *p22phox*, conhecida como flavocitocromo *b558*, a qual contém todo o aparato de transporte de elétrons da NADPH oxidase. Existem outras três subunidades citosólicas (*p47phox*, *p67phox* e *p40phox*) e uma de baixa massa molecular a G-proteína (Rac2). Quando a célula está em repouso seus componentes ficam separados. Quando a célula recebe um estímulo essas subunidades dispersas se reúnem e o complexo é ativado (Quinn & Gauss, 2004; Cross,

& Segal, 2004). Desse modo, é possível sugerir que mutações em algumas dessas subunidades possam interferir na atividade do complexo NADPH oxidase, alterando a produção de ROS.

1.10.1. Polimorfismos na subunidade p22phox

O complexo NADPH oxidase vascular é uma das principais fontes de radicais livres, tais como ânion superóxido, o qual é um precursor para uma variedade de oxidantes potentes em vasos sanguíneos humanos (Cahilly, 2000). A subunidade p22phox é um dos componentes principais da NADPH oxidase, essencial para a montagem e ativação do complexo e desempenha um papel crítico na produção de ROS na parede do vaso (Ushio-Fukai, 1996).

O gene *Cytochrome b(-245), Alpha Subunit (CYBA)*, OMIM: +608508, codifica a subunidade alfa, também conhecida como cadeia leve do citocromo b(-245), denominada p22phox, a qual é uma das subunidades do complexo NADPH oxidase. Este gene está localizado no cromossomo 16q24 contendo 6 exons, sendo demonstrado na figura 7 (Dinauer et al., 1990). Estudos recentes têm demonstrado que polimorfismos neste gene como os C242T e o -930 A/G estão associados com algumas doenças.

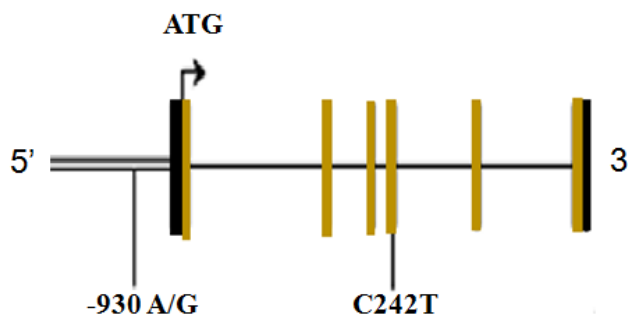


Figura 7. Representação do gene *CYBA* e localização dos polimorfismos -930 A/G e C242T (Adaptado de Zalba *et al.*, 2009).

O polimorfismo C242T (rs 4673) no gene *CYBA* resulta em uma substituição de histidina por tirosina no resíduo 72, o qual está localizado no sítio de ligação do grupo heme do citocromo *b*. Devido ao resíduo de histidina estar localizado nesta região de ligação, tem sido sugerido que a substituição altere a função oxidativa do complexo NADPH (Shimo-Nakanishia et al., 2004; Whitehead, 2001). Este polimorfismo, C242T, foi relatado como um novo fator de risco patogênico para algumas doenças como acidente vascular cerebral em pacientes japoneses (Ito et al., 2000), hipertensão em pacientes ingleses (Zalba et al., 2004), e para pacientes com doença arterial coronária, em uma população Italiana (Nasti et al., 2006). Entretanto outros estudos sobre a doença arterial coronária apresentaram resultados conflitantes, relacionando o alelo T como fator protetor para a doença (Inoue et al., 1998), enquanto que em outros estudos nenhuma relação foi encontrada entre o polimorfismo C242T e a doença arterial coronária (Gardemann et al., 1999; Li et al., 1999).

Outro polimorfismo também estudado é o -930A/G (rs 9932581), localizado na região promotora do gene *CYBA* (Moreno et al., 2003). Especula-se que este polimorfismo tenha um efeito funcional na modulação da atividade transcricional do gene *CYBA* (San et al., 2004).

Trabalhos realizados por Moreno e colaboradores em 2003 relataram a associação do polimorfismo -930 A/G com a hipertensão em 156 indivíduos em uma população espanhola. O haplótipo contendo o alelo G do polimorfismo -930 A/G, juntamente com o alelo T do polimorfismo C242T citado anteriormente, está associado ao risco aumentado de asma (Izakovicova et al., 2009). Já estudos comparando genótipos para o polimorfismo -930A/G encontraram associação entre o genótipo GG e hipertensão, em uma população masculina japonesa (Kokubo et al., 2005). Entretanto

estudos na população brasileira não encontraram associação entre o polimorfismo e danos em órgãos de pacientes hipertensos (Sales et al., 2007). Da mesma forma o polimorfismo não foi associado com nefropatia diabética secundária para diabetes mellitus tipo 2 em 612 indivíduos chineses (Lim et al., 2006).

1.11. Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas que, em baixas concentrações (quando comparadas às moléculas oxidáveis), são capazes de prevenir ou inibir a oxidação de substratos. Os antioxidantes podem ser não enzimáticos, como por exemplo, o ácido ascórbico, a glutathiona e o ácido úrico ou então, enzimático, como as enzimas heme oxigenase (HO), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (Se-GPx). Quando há um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes a favor dos pró-oxidantes ocorre o chamado estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1989).

1.12. O sistema vascular e dano oxidativo: Heme Oxigenase - HO

Na anemia falciforme a taxa de hemólise é muito alta, devido à grande instabilidade dos eritrócitos. Desta forma, a liberação do ferro heme reativo é muito elevada nesta doença. A molécula heme livre em excesso pode causar dano celular e lesão tecidual, uma vez que o heme catalisa a formação de ROS, resultando em estresse oxidativo (Vercellotti et al., 1994; Jeney et al., 2002). Uma maneira que o organismo encontrou para se proteger contra o excesso de heme livre, produzido durante a hemólise, foi através da enzima heme oxigenase (HO) e a ferritina (Balla et al., 1992).

A HO é uma enzima antioxidante que age na quebra do anel porfirínico do heme para produzir biliverdina, ferro livre, e monóxido de carbono, desempenhando assim um papel vital na citoproteção de tecidos (Figura 8) (Otterbein et al., 2003).

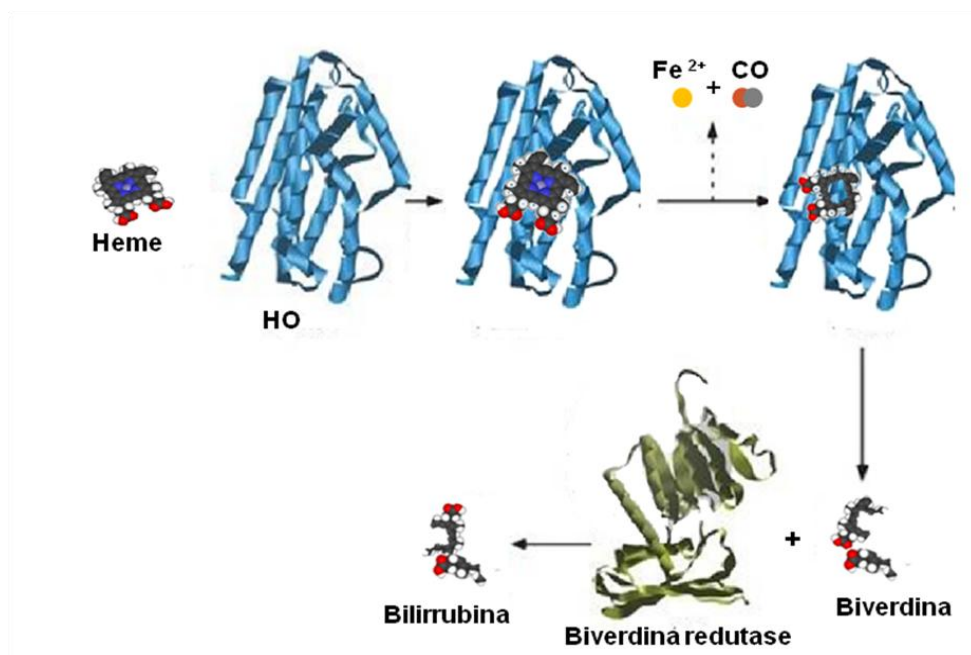


Figura 8. Representação da função da enzima HO. Esta enzima se liga ao grupo heme livre reativo, liberando uma molécula de ferro e uma molécula de CO, produzindo a biliverdina que em seguida é convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase.

Três isoformas da HO foram descritas, das quais duas são expressas constitutivamente, a heme oxigenase 2 (HO-2) e a heme oxigenase 3 (HO-3), (Rublevskaya & Maines, 1994; McCoubrey et al., 1997), e uma isoforma induzível a heme oxigenase 1 (HO-1), que é transcricionalmente induzida por uma variedade de agentes, tais como o heme, oxidantes, hipóxia, endotoxinas e citocinas (Maines, 1997). Estudos mostraram que a superexpressão da HO-1 melhora a inflamação, em parte, através de sua capacidade de inibir a expressão de moléculas que se aderem às células endoteliais e aos leucócitos *in vivo* e *in vitro* (Wagener et al., 2001; Soares et al., 2004; Wagener et al., 1999). Outros trabalhos complementares mostraram que a indução de

HO-1 protege os tecidos e as células contra a isquemia reperfusão, estresse oxidativo, inflamação, rejeição de transplantes, apoptose e proliferação celular (Otterbein et al., 2003; Wagener et al., 2003). Por outro lado, a deficiência em HO-1 em seres humanos e camundongos mostrou maior propensão às lesões oxidantes (Wagener et al., 1999; Yachie et al., 1999; Kawashima et al., 2003) e ao aumento da expressão de moléculas de adesão (Hayashi et al., 1999; Rucker et al., 2001). Assim, é possível supor que a HO-1 desempenhe um importante papel anti-inflamatório, em particular na anemia falciforme.

1.12.1. Polimorfismos no gene *HMOX-1*

A enzima heme oxigenase 1 é codificada pelo gene *HMOX-1*, o qual está localizado no cromossomo 22q13.1, apresentando 6 exons, OMIM: +141250. Neste gene o polimorfismo -413 T/A (rs 2071746), presente na região promotora, vem sendo estudado e associado a algumas doenças. Análises feitas para este polimorfismo relataram que o alelo A tem uma atividade significativamente aumentada da enzima em relação ao alelo T. Neste mesmo estudo Ono et al., em 2004 associaram o genótipo AA com a redução da incidência de doença isquêmica do coração, e em outros estudos foi observado um efeito sinérgico do genótipo TT juntamente com outro polimorfismo do gene *GSK3b*, de forma que este efeito sinérgico ofereceu quatro vezes mais risco de indivíduos desenvolverem doença de Parkinson (Infante et al., 2010). Outros estudos relacionaram o genótipo AA com a incidência elevada de hipertensão em mulheres japonesas (Ono et al., 2003). Associação foi relatada também entre a presença de apenas um alelo A e a sobrevida de enxerto após transplante de fígado (Buis et al., 2007). Entretanto, estudos sobre artrite reumatóide e possível associação com o polimorfismo não obtiveram nenhuma significância estatística (Rueda et al., 2007).

Desta forma, por esses polimorfismos estarem associados a doenças vasculares e, devido às várias complicações na anemia falciforme serem geradas por comprometimento vascular, acreditamos que os mesmos desempenhem um importante papel no desenvolvimento das manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme.

1.13. Justificativa

Estudos realizados por Repka e colaboradores, 1991, em pacientes com anemia falciforme detectaram níveis de estresse oxidativo elevados, e posteriormente associaram o estresse oxidativo às várias complicações observadas na doença. Alguns polimorfismos em genes envolvidos na via de estresse oxidativo, tiveram forte associação com algumas doenças vasculares. Desta forma, considerando que as complicações na anemia falciforme são frequentemente decorrentes de acometimento vascular, esses polimorfismos poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento de um quadro clínico mais grave nesta doença.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Analisar os polimorfismos C242T e -930 A/G presentes no gene *CYBA* e o polimorfismo -413 T/A presente no gene *HMOX-1* e realizar a associação entre os genótipos e os escores de gravidade obtidos a partir do índice geral e do índice pediátrico nos pacientes com anemia falciforme.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

O recrutamento de pacientes portadores de anemia falciforme foi realizado pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE localizado em Recife/PE, no período de junho de 2010 a agosto de 2011. Para esta pesquisa foram selecionados 169 pacientes com idade entre 3 e 48 anos, não relacionados (não mais de um paciente por família). Todos os pacientes são provenientes do Estado de Pernambuco.

O protocolo de pesquisa segue os princípios enunciados na Declaração de Helsinque, assim como as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE. Os pacientes selecionados para o estudo foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, podendo ou não aceitar participar da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência médica. O projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE (Anexos 4 e 5).

3.1.1. Critérios de inclusão

Para que fossem incluídos no estudo, os pacientes deveriam preencher os seguintes critérios:

- Idade acima de seis meses (devido neste período os níveis HbF serem altos, em consequência a ausência de manifestações clínicas);
- Ter realizado a última transfusão em no mínimo 3 meses, para assegurar que a amostra de DNA analisada seja do próprio paciente;

- Pacientes não relacionados (para esse critério o nome da mãe e do pai foi verificado para não haver risco de incluir irmãos ou até mesmo os pais na amostra)

3.1.2. Critérios de exclusão

A presença de qualquer dos seguintes critérios resultou em exclusão do paciente do estudo.

- Presença de outra hemoglobinopatia como: alfa-talassemia ou beta-talassemia;
- Estar em regime de transfusão.

3.1.3. Amostra da população do Estado de Pernambuco

Devido ao fato de não haver informações sobre estes três polimorfismos na população de Pernambuco foram realizadas as análises genotípicas em 111 indivíduos negros saudáveis (não portadores do traço falciforme), doadores de sangue, provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, para se conhecer a frequência alélica e genotípica destes polimorfismos nesta população.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta dos dados clínicos e laboratoriais

Para atribuir os escores de gravidade aos pacientes, foi necessária a coleta de dados clínicos e laboratoriais. Essa coleta foi obtida a partir da consulta aos prontuários de todos os pacientes, de modo que os dados clínicos considerados foram: presença de acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda, úlcera de perna, necrose avascular, crises algicas, sequestro esplênico, sequestro hepático, sepsis, pressão arterial, priapismo. Para os dados laboratoriais foram coletados: reticulócitos (%), bilirrubina (mg/dL), células brancas do sangue (WBC (10^3 /mL)), volume corpuscular médio (VCM

($10^3/\text{mL}$)), Hb (g/dL), LHD (U/L), HbS (%) e HbF (%). Foram coletados sempre os primeiros dados do prontuário, visto que estes pacientes estavam iniciando seu tratamento no centro e, provavelmente, não faziam uso de medicamentos para controle da doença.

3.2.2. Coleta de amostras de sangue periférico

Foram colhidos de 6 a 12 mL de sangue periférico em frasco estéril VACUETTE® de 6 mL, contendo 10,8 mg do anticoagulante etilenodiaminotetracetato dissódico 2H₂O (EDTA) 0,5M pH 8,0 (Greiner Bio-One Brasil, Americana, SP, Brasil), para todos os indivíduos incluídos no estudo para extração de DNA genômico.

3.2.3. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de sangue periférico utilizando a metodologia de fenol/clorofórmio (Sambrook et al., 1989), lise das células com proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e precipitação do DNA em etanol absoluto, conforme descrito no anexo 1.

A verificação da integridade do DNA genômico extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, com 2% de brometo de etídio, em TBE 1X, preparado segundo protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de azul de bromofenol; 50% glicose) na razão de 3:1. As condições de eletroforese variaram entre 90 e 110 V. O marcador de peso molecular utilizado foi o “DNA ladder” de 100 pb (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), em concentração de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após a eletroforese, o gel foi visualizado e fotografado em transluminador de luz ultravioleta

com câmera integrada (Molecular Imaging, L-PIX, Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

3.2.4. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Foram escolhidos pares de iniciadores para a amplificação das três regiões contendo os polimorfismos, por meio do programa “primer 3” (Cambridge, MD, USA), baseando-se nas sequências dos genes *CYBA* (OMIM: +608508) e *HMOX-1* (OMIM: +141250). As sequências dos iniciadores, assim como os tamanhos dos fragmentos e temperaturas de anelamento encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos usados como “primers” (Direto e Reverso) na amplificação (PCR) dos genes *CYBA* e *HMOX-1*, tamanhos dos fragmentos (pb) e temperatura de anelamento (°C).

Gene	Polimorfismo	Sequências dos primers	Tamanho (pb)	T (°C)
<i>CYBA</i>	C242T (rs 4673)	(D) 5'-GGGACAGAAGTACATGACCGCCGTG-3'	418	61
		(R) 5'-GCGGTCATGTACTTCTGTCCCCAGC-3'		
<i>CYBA</i>	-930 A/G (rs 9932581)	(D) 5'-GGGGAATAAACCAGCATTACTGCCTCCGGCCTCCG-3'	381	63
		(R) 5'-CGGAGGCCGGAGGCAGTAATGCTGGTTTATTCCCC-3'		
<i>HMOX-1</i>	-413 T/A (rs 2071746)	(D) 5'-TGACATTTTAGGGAGCTGGAGACA-3'	287	62
		(R) 5'-AGGCGTCCCAGAAGGTTCCA-3'		

D: Direto; R: Reverso; pb: Pares de bases; T: Temperatura; °C: Graus Celsius.

Para os três regiões, a PCR foi preparada com 40 a 100 ng de DNA genômico, 20 pmoles dos iniciadores direto e reverso, 20 pmoles de cada didesoxinucleotídeo

(dNTP), tampão da enzima 1X (Tampão 10X: Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen TM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (v:v), somente para a região contendo o polimorfismo - 413 T/A presente no gene *HMOX-1*, e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL.

As amostras foram amplificadas em aparelhos termocicladores MasterCycler EP Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany) e Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA). As condições de amplificação foram as mesmas para todas as regiões gênicas, exceto para as temperaturas de anelamento, especificadas na tabela 1: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 95 °C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores em temperaturas específicas para cada região por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, finalizando-se com extensão adicional a 72 °C por 7 minutos. As temperaturas e duração dos ciclos para cada região foram determinadas após testes de padronização.

Para a quantificação do produto amplificado, 2,0 µL do material purificado foram aplicados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese e examinado sob luz ultravioleta. A concentração de DNA da amostra purificada foi estimada a partir da comparação com a intensidade da banda do marcador de peso e massa molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

3.2.5. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos iniciadores das PCRs, segundo o método de Sanger et al. (1975), utilizando-se o kit ABI PRISM Big

Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA)

Reagentes para a reação de sequenciamento

Produto da PCR purificado	40 - 80 ηg
Tampão Big Dye 5x (fornecido pelo fabricante)	2 μL
Big Dye (fornecido pelo fabricante)	2 μL
Iniciador direto ou reverso (5 pmol/μL)	1 μL
H ₂ O ultra-pura	q.s.p. 10 μL

As condições da reação de sequenciamento foram as seguintes: desnaturação inicial a 96 °C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos a 96 °C por 1 minuto, a 57 °C por 10 segundos e a 60 °C por 4 minutos. Após esta reação, as amostras foram purificadas para eliminação dos nucleotídeos não incorporados (Anexo 2).

As amostras foram ressuspensas em 10 μL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA), desnaturadas a 95°C por 5 minutos, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese no analisador automático ABI PRISM 3700 ou ABI PRISM 3130 DNA Analyzers (Applied Biosystem-Applera Corporation, Foster City, CA, EUA). As sequencias obtidas foram analisadas e os polimorfismos foram identificados com o auxílio do programa FinchTV (Geospiza).

3.2.6. Escore para o grau de severidade

Todos os pacientes que entraram no estudo obtiveram um escore de acordo com o grau de gravidade da doença. Para atribuição destes escores, dois índices, foram utilizados, um proposto em 2007 por Sebastiani e colaboradores (índice geral) e o outro

proposto em 2010 por Xandra e colaboradores (índice pediátrico). O primeiro índice pode ser aplicado em paciente de qualquer faixa etária, já o segundo índice somente em paciente pediátricos (menores de 18 anos). Desta forma, o primeiro foi utilizado em todos os 169 pacientes envolvidos no estudo, e o segundo somente nos pacientes pediátricos, que consistiram de 101 dos 169 pacientes.

No índice geral a atribuição dos escores foi realizada “online” pelo site (<http://155.41.217.225/dss-calculator/index.php>), através de informações clínicas e laboratoriais como: idade, sexo, presença de síndrome torácica aguda, necrose avascular, transfusão, dores, priapismo, sepsis, acidente vascular cerebral, pressão arterial, bilirrubina (mg/dL), LDH (U/L), MVC ($10^3/\text{mL}$), contagem de reticulócitos (%) e contagem de WBC ($10^3/\text{mL}$), os valores de referências para os parâmetros laboratoriais estão descritos no anexo 3. A partir destas informações foi obtido um escore, o qual representa a chance do paciente morrer em cerca de 5 anos. O escore varia de 0 a 1, onde quanto mais próximo de 1, maior é a chance de morte e consequentemente a gravidade do paciente.

A atribuição do escore utilizando-se o índice pediátrico foi realizada a partir de dados clínicos e laboratoriais obtidos de cada paciente, sendo eles: necrose avascular, acidente vascular cerebral, sequestro esplênico, sequestro hepático, priapismo, síndrome torácica aguda, crises algicas, leucócitos ($10^6/\text{mm}^3$), HbF (%), LDH (U/L). Os dados clínicos e laboratoriais foram analisados, de forma que pontos foram atribuídos a cada paciente a partir de alguns critérios como descrito na tabela 2. Através do somatório desses pontos cada paciente obteve um escore final, o qual foi utilizado para a análise estatística. Neste índice o escore pode variar de 0 a 270, de modo que os pacientes mais graves apresentam valores mais próximos a 270. Os autores dos dois índices não sugerem limiares que classifiquem esses pacientes em grau leve, intermediário ou grave

da doença. Desta forma as análises estatísticas foram realizadas com os valores contínuos obtidos através de cada índice.

Tabela 2. Atribuição da pontuação aos dados clínicos e laboratoriais, através do índice pediátrico.

Dados clínicos e laboratoriais	Classificação	Pontuação
Necrose Avascular	se presente	10
Acidente Vascular Cerebral	se presente	50
Sequestro Hepático	se presente	50
Meningites/ Septicemia	se presente	50
Priapismo	se presente	10
Sequestro Esplênico	se presente	50
Síndrome Torácica Aguda	ausência; presença ou ≥ 2 eventos em 2 anos	0; 10; 20
Crises Álgicas	ausência; presença ou ≥ 2 eventos em 2 anos	0; 5; 10
Hemoglobina (g/dL)	se $\leq 6.6 \text{ g dL}^{-1}$	5
HbF(%)	se $\leq 3.0\%$	5
LDH (U/L)	se $> 700 \text{ U L}^{-1}$	5
Leucócitos ($10^9/\text{L}$)	se $\geq 15.2 \times 10^9/\text{L}$	5

3.2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas em dois grupos separados de escores, o primeiro composto pelos escores de gravidade obtidos pelo índice geral em todos os pacientes e o segundo grupo composto pelos escores de gravidade obtidos pelo índice pediátrico somente nas crianças com anemia falciforme.

As análises foram iniciadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a partir do qual foi verificado se pelo menos um dos genótipos de cada polimorfismo apresentava diferença, quanto aos valores dos escores. Em seguida, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar a diferença entre as médias dos escores de cada grupo genotípico. Para este teste os valores dos escores foram divididos em dois grupos, sendo o primeiro grupo composto por escores relacionados a apenas um genótipo e o segundo grupo composto por escores relacionados a dois genótipos (exemplo: um grupo de escores relacionados ao genótipo AA e outro grupo de escores relacionados aos genótipos AG e GG do polimorfismo -930 A/G), desta forma as médias dos dois grupos foram comparadas para verificar se havia diferença estatística entre elas.

Na tentativa de investigar a associação entre os genótipos e as variáveis clínicas e laboratoriais, foram realizados os testes de regressão linear e logística, os quais incluíram todos os pacientes.

Os genótipos dos três polimorfismos, obtidos nos indivíduos negros saudáveis foram analisados quanto à sua distribuição, através do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Identificação dos genótipos para os polimorfismos C242T -930 A/G e -413 T/A.

A Identificação dos genótipos para os polimorfismos C242T e -930 A/G presentes no gene *CYBA* e o polimorfismo -413 T/A presente no gene *HMOX-1* foi realizada em todos os pacientes com anemia falciforme, onde as sequencias contendo os alelos mutantes e selvagens, dos respectivos polimorfismos, estão demonstradas nas figuras 9,10 e 11.

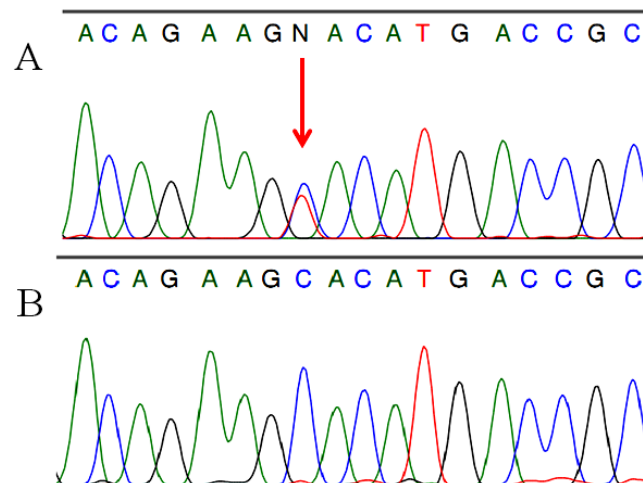


Figura 9. Em A, está representada a sequencia do gene *CYBA*, onde a seta está indicando a posição do polimorfismo C242T, o qual se apresenta em heterozigose. Em B, está representada a mesma sequencia vista em A, porém contendo o alelo selvagem C para o mesmo polimorfismo.

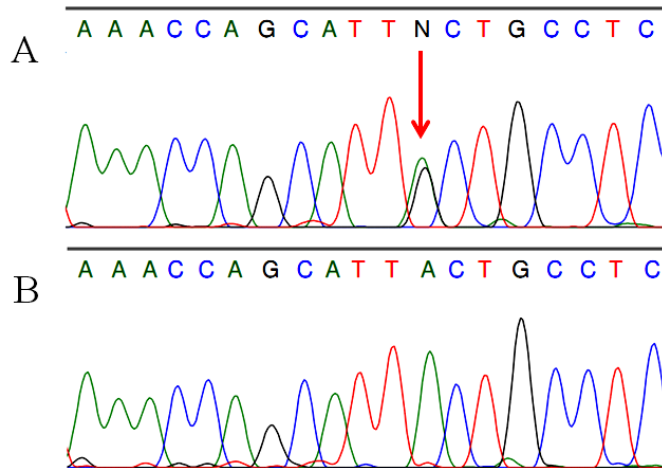


Figura 10. Em A, está representada a sequência do gene *CYBA*, onde o polimorfismo -930 A/G está indicado através da seta, o qual se apresenta em heterozigose. Em B, está representada a mesma sequência do gene *CYBA*, porém contendo o alelo selvagem A para o mesmo polimorfismo.

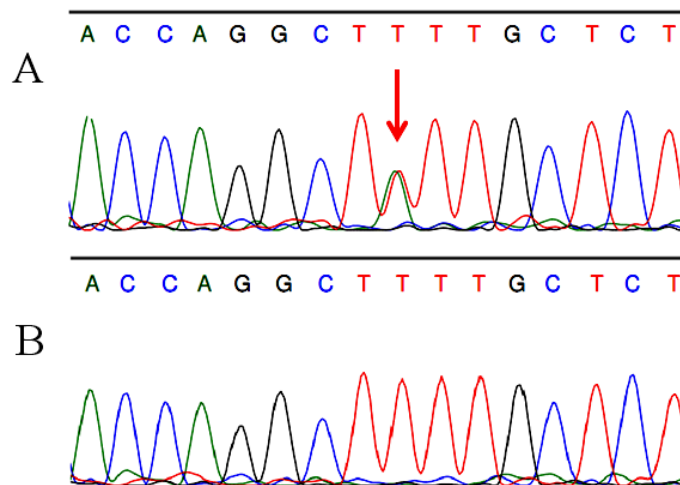


Figura 11. Em A, está representada a sequência do gene *HMOX-1*, de modo que a seta está indicando o polimorfismo -413 T/A, o qual se apresenta em heterozigose. Em B, está representada a mesma sequência vista em A, porém contendo o alelo selvagem T para o polimorfismo -413 T/A.

As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A foram determinadas levando-se em consideração todos os pacientes com a doença e estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Frequências genóticas e alélicas dos três polimorfismos estudados: C242T, -930 A/G e -413 T/A em todos os pacientes com anemia falciforme (n=169).

Polimorfismo	Genótipos e Alelos	n (Freq %)
C242T (rs4673)	CC	78(46)
	CT	74(44)
	TT	17(10)
	C	(68)
	T	(32)
-930 A/G (rs9932581)	AA	28(16,5)
	AG	93(55)
	GG	48(28,5)
	A	(44)
	G	(56)
- 413 T/A (rs2071746)	TT	41(24)
	TA	81(48)
	AA	47(28)
	T	(48)
	A	(52)

4.2. Atribuição dos escores

Através do índice geral foram atribuídos escores a todos os pacientes com anemia falciforme que entraram no estudo, de modo que a média e \pm SD dos escores foi de $(0,473 \pm 0,382)$. A partir do índice pediátrico foram atribuídos escores somente as crianças com anemia falciforme, onde a média e \pm SD dos escores foi de (55 ± 37) .

4.3. Análises a partir do índice geral em todos os pacientes

4.3.1. Distribuição dos escores entre os genótipos

A distribuição dos escores entre os genótipos obtidos a partir das análises em todos os pacientes está descrita na figura 6. Nesta figura podemos observar uma diferença da mediana dos escores no genótipo CT em relação aos outros genótipos do polimorfismo C242T, indicando uma possível associação deste genótipo com escores elevados de gravidade. Já para os polimorfismos -930 A/G e -413 T/A não foi observado diferença das medianas entre os genótipos.

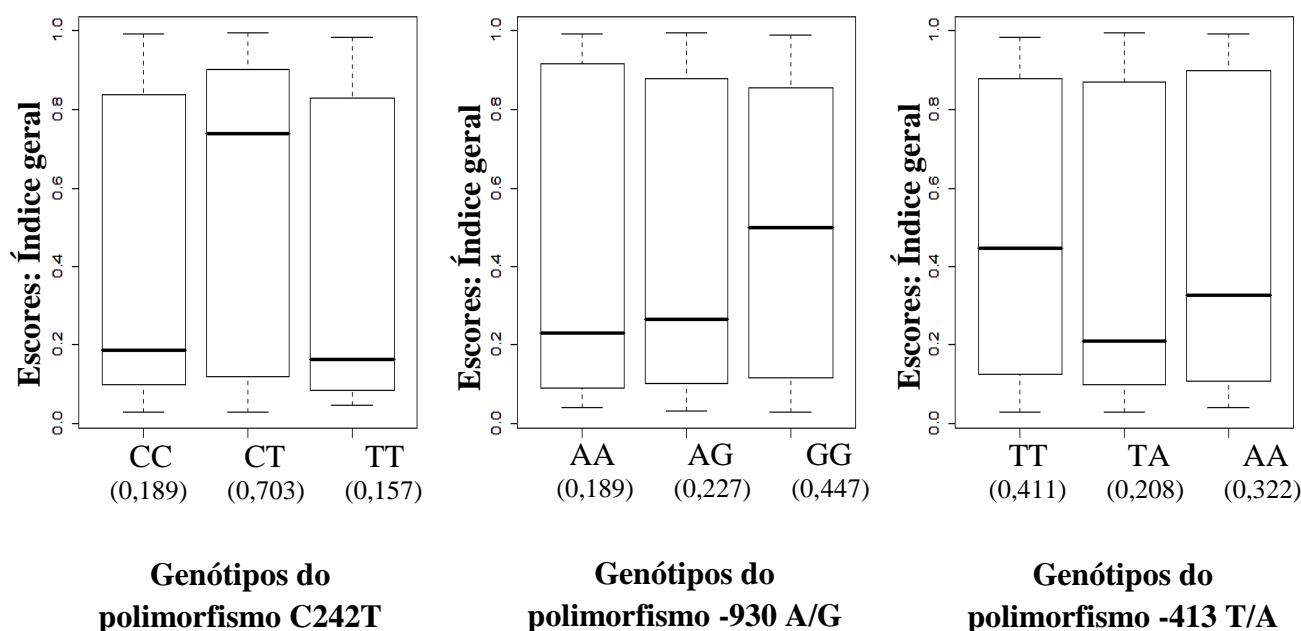


Figura 12. Distribuição dos escores entre os genótipos dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A, obtidos através do índice geral para os 169 pacientes. A mediana está representada abaixo de cada um dos genótipos.

4.3.2. Análises pelo teste estatístico Kruskal-Wallis

As análises foram iniciadas pelo teste de Kruskal-Wallis para que fosse verificado se, pelo menos, um dos genótipos de cada polimorfismo apresentava diferença, quanto aos valores dos escores relacionados a eles, sendo esses escores obtidos através do índice geral. Este teste foi realizado comparando os três genótipos de cada polimorfismo, onde os resultados obtidos desta comparação não apresentaram diferença estatística, obtendo p-valores de 0,1743, 0,9399, 0,6327 para os respectivos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A, mostrando que não há diferença quando comparados os três genótipos juntos.

4.3.3. Análises pelo teste estatístico Mann-Whitney

O teste estatístico de Mann-Whitney foi aplicado para testar a hipótese de dominância dos alelos, onde as análises foram realizadas a partir da comparação de dois grupos genotípicos, sendo um composto por um único genótipo e o outro composto por dois genótipos. Este teste comparou as médias de escores obtidas dos dois grupos genotípicos e analisou se havia diferença estatística entre elas. Desta forma, foi realizada uma análise exploratória de cada grupo genotípico, onde os resultados não mostraram diferença significativa entre as médias dos escores dos grupos genotípicos testados, como descritos na tabela 4.

Tabela 4. Grupos de genótipos testados e as médias dos escores relacionados a eles, sendo esses escores obtidos através do índice geral em todos os 169 pacientes.

Polimorfismo	Genótipos testados (\bar{X} dos escores)	p-valor
C242T	CC (0.42) x CT+TT (0.51)	0.1944
	CT (0.54) x CC+TT (0.41)	0.0665
	TT (0.38) x CT+CC (0.48)	0.3827
-930 A/G	AA (0.48) x AG+GG (0.47)	0.7336
	AG (0.46) x AA+GG (0.48)	0.8114
	GG (0.49) x AG+AA (0.46)	0.9875
-413 T/A	TT (0.47) x TA+AA (0.47)	0.8373
	TA (0.45) x AA+TT (0.49)	0.5027
	AA (0.51) x TA+TT (0.46)	0.3444

X: Média; x: Versus.

4.4. Análises a partir do índice pediátrico

4.4.1. Distribuição dos escores entre os genótipos

O índice pediátrico foi aplicado somente nas crianças com anemia falciforme que consistiram de 101 dos 169 pacientes. A distribuição dos escores entre os genótipos dos três polimorfismos foi visualizada a partir de *boxplots*, sendo demonstrada na figura 7, onde podemos observar uma diferença da mediana dos escores de gravidade no genótipo AA comparada as medianas dos genótipos AG e GG do polimorfismo -930 A/G presente no gene *CYBA*. As análises estatísticas foram aplicadas a todos os genótipos para testar a possível associação entre os escores do índice pediátrico e os genótipos.

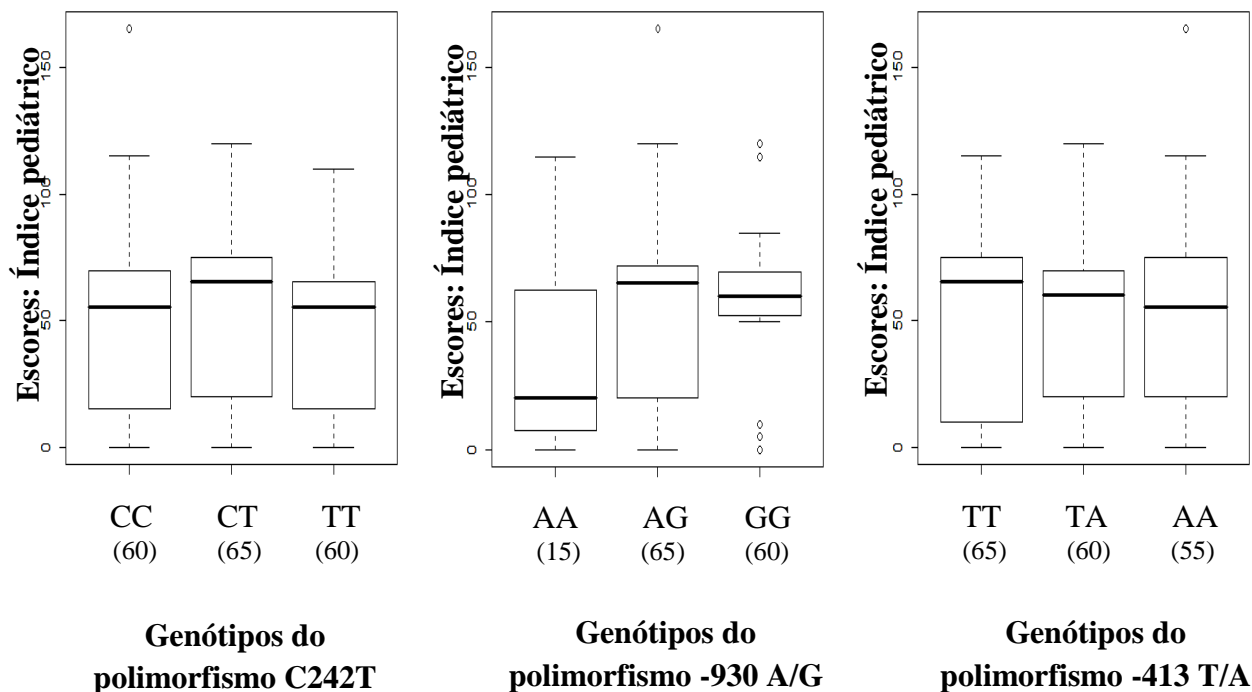


Figura 13. Distribuição dos escores entre os genótipos dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A, obtidos através do índice pediátrico nas crianças com anemia falciforme. A mediana está representada abaixo de cada um dos genótipos.

4.3.3. Análises pelo teste estatístico kruskal-Wallis

Através do teste de Kruskal-Wallis foi verificado se, pelo menos, um dos genótipos de cada polimorfismo apresentava diferença, quanto aos valores dos escores relacionados a eles. Os resultados obtidos a partir do índice pediátrico não apresentaram diferença estatística, mostrando que não há diferença quando comparados os três genótipos juntos. Os p-valores obtidos nesta análise foram 0,3724, 0,1056, 0,9031 para os respectivos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A.

4.3.4. Análises pelo teste estatístico Mann-Whitney

Da mesma forma como o teste de Mann-Whitney foi aplicado no índice geral foi aplicado também para o índice pediátrico, a partir da comparação das médias de escores

de dois grupos genotípicos, sendo um composto por um único genótipo e o outro composto por dois genótipos.

A partir dos resultados foi encontrada uma diferença significativa para o genótipo AA do polimorfismo -930 A/G, onde a média dos escores mostrou-se estatisticamente mais baixa comparada a média dos escores dos genótipos AG e GG juntos, apresentando um p-valor de 0.0392, como descrito na tabela 5. Desta forma podemos inferir que pacientes com genótipo AA apresentam em média escores mais baixos para a severidade da doença comparada aos outros dois genótipos.

Tabela 5. Grupos de genótipos testados e as médias dos escores relacionados a eles, sendo esses escores obtidos através do índice pediátrico nos 101 pacientes pediátricos.

Polimorfismo	Genótipos testados (\bar{X} dos escores)	p-valor
C242T	CC (52) x CT+TT (56)	0.3269
	CT (58) x CC+TT (50)	0.1708
	TT (46) x CT+CC (55)	0.4954
-930 A/G	AA (40) x AG+GG (57)	0.0392*
	AG (58) x AA+GG (50)	0.1591
	GG (56) x AG+AA (54)	0.8564
-413 T/A	TT (51) x TA+AA (55)	0.7018
	TA (53) x AA+TT (55)	0.9945
	AA (58) x TA+TT (53)	0.7233

X: Média; x: *Versus*; *: Estatisticamente significativo.

4.4. Análises das variáveis clínicas e laboratoriais

Os 169 pacientes que entraram no estudo foram investigados quanto à associação entre os genótipos e as variáveis clínicas e laboratoriais, a partir de análises com o teste de regressão linear para as variáveis contínuas e regressão logística para as variáveis categóricas. Algumas variáveis, por não terem elementos suficientes, foram excluídas da análise (exemplo: na variável sequestro hepático, dos 169 pacientes, apenas 2 apresentaram a complicação, dessa forma a variável foi excluída da análise). As variáveis clínicas e laboratoriais utilizadas nos testes estão descritas nas tabelas 6 e 7 respectivamente.

Tabela 6. Frequências das variáveis clínicas obtidas nos 169 pacientes com anemia falciforme.

Variáveis Clínicas	n (Freq %)
Síndrome torácica aguda (STA)	12 (7)
Acidente vascular cerebral (AVC)	36 (21)
Necrose avascular	21 (12)
Crises álgicas	103 (60)
Úlcera de perna	10 (6)

Tabela 7. Média e desvio padrão das variáveis laboratoriais obtidas nos 169 pacientes com anemia falciforme.

Variáveis Laboratoriais	Média e Desvio padrão
Bilirrubina (mg/dL)	3,87 ± 5,26
Volume corpuscular médio (MCV - 10 ³ /mL)	90,96 ± 10,05
Hemoglobina (Hb – g/dL)	7,7 ± 1,33
Hemoglobina Fetal (HbF %)	8,89 ± 6,93
Células Brancas do Sangue (WBC - 10 ³ /mL)	13,25 ± 5,42
Reticulócitos	8,96 ± 4,33
Dehidrogenase láctica (LDH - U/L)	964 ± 625

Os testes de regressão logística e linear foram realizados para cada uma das variáveis clínicas e laboratoriais e os resultados obtidos mostraram associação da variável crises álgicas com o genótipo CT do polimorfismo C242T, apresentando p-valor de 0.00201 e também associação da variável HbF com o genótipo TT do polimorfismo -413 T/A, apresentando p-valor de 0.0337, como descrito na tabela 8.

Tabela 8. Resultados dos p-valores obtidos através dos testes de associação entre as variáveis, clínicas e laboratoriais, e os genótipos dos polimorfismos C242T, -930 A/G e -413 T/A.

Variáveis Clínicas e Laboratoriais	Genótipos para o polimorfismo C242T (p-valor)			Genótipos para o polimorfismo -930 A/G (p-valor)			Genótipos para o polimorfismo -413 T/A (p-valor)		
	CC	CT	TT	AA	AG	GG	TT	TA	AA
Síndrome torácica aguda (STA)	(0.609)	(0.700)	(0.994)	(0.387)	(0.995)	(0.995)	(0.520)	(0.830)	(0.771)
Acidente vascular cerebral (AVC)	(0.2567)	(0.827)	(0.954)	(0.551)	(0.5391)	(0.8551)	(0.632)	(0.502)	(0.309)
Necrose avascular	(0.3856)	(0.1676)	(0.0667)	(0.307)	(0.9225)	(0.2860)	(0.8096)	(0.3119)	(0.981)
Crises álgicas	(0.978)	(0.00235)*	(0.8772)	(0.570)	(0.7634)	(0.4216)	(0.6311)	(0.7724)	(0.709)
Úlcera de perna	(0.687)	(0.587)	(0.994)	(0.741)	(0.4694)	(0.9935)	(0.891)	(0.497)	(0.298)
Bilirrubina (mg/dL)	(0.897)	(0.647)	(0.760)	(0.389)	(0.126)	(0.194)	(0.9896)	(0.3323)	(0.729)
Volume corpuscular médio (MCV - 10 ³ /mL)	(0.709)	(0.687)	(0.672)	(0.621)	(0.225)	(0.651)	(0.271)	(0.756)	(0.478)
Hemoglobina (Hb - g/dL)	(0.556)	(0.870)	(0.674)	(0.243)	(0.334)	(0.472)	(0.132)	(0.725)	(0.388)
Hemoglobina Fetal (HbF %)	(0.899)	(0.777)	(0.681)	(0.987)	(0.7048)	(0.3580)	(0.0337)*	(0.828)	(0.698)
Células Brancas do Sangue (WBC - 10 ³ /mL)	(0.754)	(0.1771)	(0.1172)	(0.602)	(0.5422)	(0.2934)	(0.110)	(0.0607)	(0.742)
Reticulócitos	(0.484)	(0.132)	(0.666)	(0.276)	(0.752)	(0.282)	(0.660)	(0.643)	(0.706)
Desidrogenase láctica (LDH - U/L)	(0.783)	(0.5920)	(0.3342)	(0.991)	(0.1442)	(0.0558)	(0.6637)	(0.5873)	(0.564)

*: Estatisticamente significativo.

Para verificar se o genótipo CT do polimorfismo C242T estava associado à ausência ou a presença de crises álgicas, foi construído um histograma, o qual mostra a frequência das crises álgicas nos três genótipos deste polimorfismo, onde é possível observar que no genótipo CT os eventos de crises álgicas estão em maior frequência comparado aos outros genótipos, como descrito na figura 12.

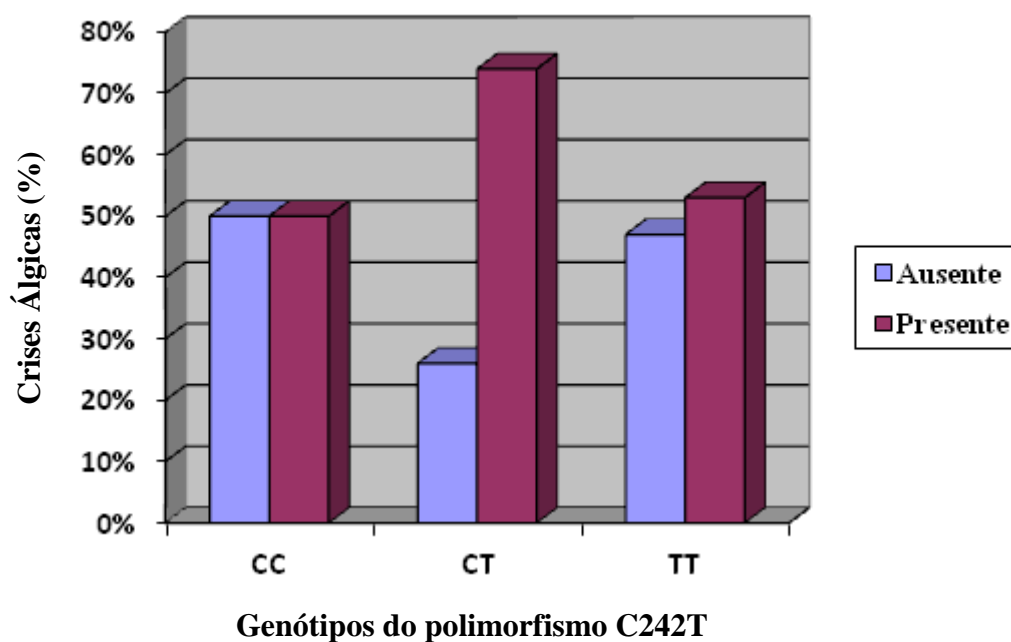


Figura 14. Frequência da variável crises álgicas nos três genótipos do polimorfismo C242T do gene *CYBA*. Os eventos de crises álgicas mostrou-se mais frequente em pacientes com o genótipo CT.

Em seguida, a partir da variável HbF foi construído um *boxplot* para visualizar a qual nível de HbF o genótipo TT do polimorfismo -413 T/A apresentou associação. O *boxplot* está representado na figura 13, onde, através deste, é possível inferir que o genótipo TT está associado a níveis mais altos de HbF em pacientes com anemia falciforme.

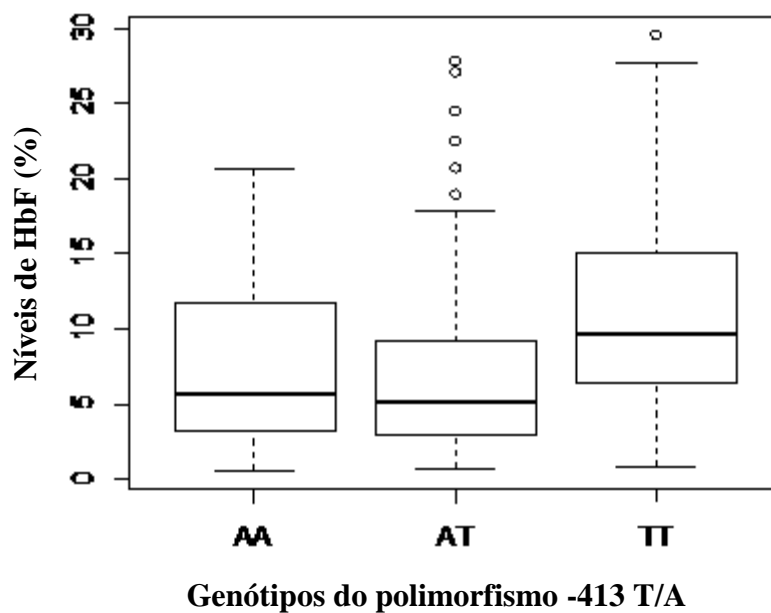


Figura 15. Distribuição da variável HbF entre os genótipos do polimorfismo -413 T/A do gene *HMOX-1*, onde é possível observar que os níveis de HbF estão mais elevados na presença do genótipo TT do polimorfismo -413 T/A.

4.5. Indivíduos negros saudáveis

A frequência dos genótipos para os três polimorfismos obtidos através dos indivíduos negros saudáveis foram testados quanto a sua distribuição. Os resultados encontrados estavam de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências genotípicas e alélicas estão descritas na tabela 9.

Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas dos três polimorfismos estudados: C242T, -930 A/G e -413 T/A nos 111 indivíduos negros saudáveis.

Polimorfismo	Genótipos e Alelos	n (Freq %)
C242T (rs4673)	CC	51(46)
	CT	42(38)
	TT	18(16)
	C	(65)
	T	(35)
-930 A/G (rs9932581)	AA	16(14)
	AG	47(42)
	GG	48(43)
	A	(36)
	G	(64)
- 413 T/A (rs2071746)	TT	22(20)
	TA	69(62)
	AA	20(18)
	T	(49)
	A	(51)

n: Quantidade de indivíduos.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A anemia falciforme apesar de ser decorrente da homozigidade de uma única mutação, no codon 6 do locus da β -globina, apresenta grande heterogeneidade fenotípica, de modo que alguns pacientes podem apresentar quadros clínicos mais brandos e outros mais severos da doença. Na busca de marcadores genéticos que estejam influenciando o grau de gravidade da anemia falciforme, o presente estudo se propôs a avaliar três polimorfismos (C242T, -930 A/G e -413 T/A) em genes envolvidos na via de estresse oxidativo, uma vez que o estresse oxidativo está em níveis elevados nestes pacientes, contribuindo para processo inflamatório da doença. Índices de gravidade foram utilizados (geral e pediátrico) na classificação dos pacientes quanto ao grau de gravidade, onde cada um deles possui uma metodologia distinta para a atribuição dos escores e são aplicados a grupos diferentes de pacientes.

5.1. Índice geral

O índice geral proposto por Sebastiani et al. (2007), é aplicado em pacientes com anemia falciforme, tanto pediátricos (2-18 anos) como adultos (>18 anos), possibilitando a atribuição de escores de gravidade, os quais representam o risco do paciente morrer em cerca de 5 anos, sendo possível identificar, quais os pacientes que apresentam maior gravidade para a doença. Desta forma, utilizamos este índice para obter os escores de todos os pacientes, os quais foram testados quanto à associação com os três polimorfismos. Devido a estes polimorfismos estarem associados a doenças vasculares (Ito et al., 2000), (Nasti et al., 2006), (Ono et al., 2004), esperava-se encontrar alguma associação dos mesmos com a gravidade da doença, visto que as complicações na anemia falciforme são decorrentes de acometimento vascular.

Entretanto os resultados do presente estudo não mostraram nenhuma associação com os polimorfismos testados, indicando que esses polimorfismos não estão relacionados à gravidade da doença, levando-se em conta, o índice geral, como parâmetro de gravidade. No estudo de Sebastiani et al. (2007) uma das indicações de uso do índice é em estudo de associação em variantes genéticas, porém não há na literatura estudos neste sentido, apenas um trabalho realizado por Adoop et al. (2009) validando este índice, contudo chamando a atenção dos leitores para o cuidado quanto ao uso do índice em pacientes pediátricos por atribuir escores de peso menor a pacientes <18 anos.

5.2. Índice pediátrico

Xandra et al. (2010) propuseram o índice pediátrico, o qual é específico para crianças portadoras de anemia falciforme (0-18 anos). Este índice atribui escores aos pacientes, de acordo com informações clínicas e laboratoriais, permitindo a identificação de pacientes com maior gravidade da doença. Desta forma, os escores de gravidade foram atribuídos aos pacientes pediátricos e em seguida realizada a análise de associação entre os escores e os três polimorfismos estudados. A partir dos resultados desta análise foi encontrada uma diferença significativa para o genótipo AA do polimorfismo -930 A/G, no gene *CYBA*, onde a média dos escores mostrou-se estatisticamente mais baixa comparada à média dos escores dos genótipos AG e GG juntos, apresentando um p-valor de 0,0392. Partindo destes achados, podemos inferir que pacientes com genótipo AA apresentam, em média, escores mais baixos para a gravidade da doença e conseqüentemente um quadro clínico mais brando para a anemia falciforme. Esse polimorfismo ainda não foi relatado em estudos de pacientes com anemia falciforme, mas estudos realizados em uma população espanhola encontraram associação do genótipo GG com a hipertensão, como descreve Moreno et al. (2003).

Neste mesmo estudo os autores relatam que a presença do alelo A deste polimorfismo mostrou uma menor atividade do gene *CYBA*. Este gene codifica a proteína p22phox, uma das principais subunidades do complexo NADPH, sendo a NADPH uma das principais fontes de radicais livres. Devido ao genótipo AA indicar menor expressão da proteína p22phox, isso poderia resultar na seguinte sequência de eventos: redução da atividade da NADPH; queda na geração de radicais livres; menores danos ao organismo e por fim um quadro clínico mais brando da doença. Desta forma seria possível explicar o motivo de pacientes que possuem genótipo AA apresentarem escores menores para a gravidade da doença.

Uma explicação para a significância encontrada do polimorfismo -930 A/G quando utilizado o índice pediátrico e a não significância quando utilizado o índice geral, seria o fato de estes índices apresentarem metodologias diferentes para atribuição dos escores, onde alguns eventos clínicos e testes laboratoriais são necessários para a análise em um índice, mas não são necessários para o outro índice, podendo dificultar a correspondência entre eles. Também o fato do índice proposto por Xandra acabar sendo um subgrupo (crianças com anemia falciforme) de pacientes utilizados por Sebastiani (adulto e crianças com anemia falciforme), poderia explicar esse resultado, onde o índice pediátrico pode apresentar maior especificidade para o grupo de crianças, atribuindo os escores de forma a corresponder ao comportamento da doença nesta faixa etária, visto que os pacientes pediátricos apresentam maior variabilidade para a presença das complicações, comparado aos pacientes adultos.

5.3. Análises das variáveis clínicas e laboratoriais

5.3.1 Crises álgicas

Alguns estudos têm sido realizados para a identificação de marcadores genéticos associados a complicações específicas em pacientes com anemia falciforme (Fertrin & Costa, 2010). Na tentativa de encontrar outros marcadores genéticos, os dados clínicos e laboratoriais foram explorados a partir de testes de associação entre estes e os três polimorfismos estudados. Os resultados mostraram que o genótipo CT do polimorfismo C242T no gene *CYBA* esteve associado à maior incidência de crises álgicas, apresentando um p-valor de 0.00201, indicando que pacientes com genótipo CT tem maior risco para os eventos de crises álgicas.

Estudos realizados com este polimorfismo relataram que a mudança da base C por T resulta em uma substituição de histidina por tirosina no resíduo 72. Devido a esta substituição estar em uma região de ligação com o citocromo *b*, sugere-se uma alteração da função oxidativa do complexo NADPH (Shimo-Nakanishia et al., 2004; Whitehead, 2001), mas nenhum estudo ainda examinou os efeitos funcionais do polimorfismo C242T sobre a atividade e regulação da NADPH oxidase.

Outros estudos de associação encontram o genótipo CT+TT deste polimorfismo associado com acidente vascular cerebral (Ito et al., 2000). Dois estudos de um mesmo grupo, realizados na população brasileira encontraram o alelo T associado à rigidez arterial (Oliveira et al., 2012) e à obesidade e diabetes mellitus em pacientes hipertensos (Schreiber et al., 2012). Em estudos em uma população japonesa encontraram o alelo T associado à progressão de aterosclerose coronária (Cahilly et al., 2000). Entretanto outros estudos sobre a doença arterial coronária apresentaram resultados conflitantes, relacionando o alelo T como fator protetor para a doença (Inoue et al., 1998), enquanto

que em outros estudos nenhuma relação foi encontrada entre o polimorfismo C242T e a doença arterial coronária (Gardemann et al., 1999; Li et al., 1999). No presente trabalho o genótipo CT mostrou-se associado à incidência de crises álgicas, sugerindo que este polimorfismo seja um novo marcador genético para o risco de crises álgicas em pacientes com anemia falciforme. Este resultado precisa ser tratado com um pouco de cautela, visto que a “vantagem” de heterozigotos é bem mais rara na natureza, além do mecanismo biológico por traz desta associação acabar sendo de difícil interpretação.

5.3.2. Níveis de Hemoglobina Fetal (HbF)

Os resultados mostraram também associação do genótipo TT do polimorfismo -413 T/A, no gene *HMOX-1*, com níveis elevados de HbF, apresentando p-valor de 0,0337, indicando que pacientes com anemia falciforme com genótipo TT possuem níveis de hemoglobina fetal mais elevados comparados aos pacientes que apresentam os outros dois genótipos (TA ou AA).

Não há na literatura estudos sobre o polimorfismo -413 T/A em pacientes com anemia falciforme, mas há relatos de associação com outras doenças como a incidência de doença cardíaca isquêmica, a qual foi associada ao genótipo TT (Ono et al., 2004), a hipertensão em mulheres japonesas, sendo associada ao genótipo AA (Ono et al., 2003). No presente estudo o genótipo TT esteve associado ao aumento dos níveis de HbF em pacientes com anemia falciforme. A HbF nestes pacientes age como inibidor da polimerização das hemoglobinas, dificultando o processo de falcização das hemácias, de modo a proporcionar uma melhora das manifestações clínicas da doença, quando em níveis elevados.

Estudos realizados para este polimorfismo mostraram que a presença do alelo T apresentou menor expressão do gene *HMOX-1*, comparado ao alelo A, de modo que indivíduos que apresentam o genótipo TT exibem menor expressão deste gene. Se o genótipo TT do polimorfismo -413 T/A está diretamente envolvido no aumento de HbF, uma explicação possível seria a ocorrência da seguinte sequência de eventos: redução da proteína HO-1 na circulação, devido à baixa expressão do gene *HMOX-1*; maior concentração de heme (substrato da enzima HO-1); ativação de receptores de produção de glóbulos vermelhos, em resposta à grande quantidade de heme livre (o organismo poderia estar entendendo como alta taxa de hemólise); aumento de HbF em consequência da alta produção de glóbulos vermelhos. Outra hipótese é a de que o genótipo TT não esteja contribuindo diretamente para a modulação da HbF, mas sim algum outro gene, localizado próximo a esse locus que esteja segregando junto com este alelo, o qual de alguma forma poderia estar influenciando o aumento dos níveis de HbF.

5.4. Indivíduos negros saudáveis

A partir de amostras de indivíduos negros saudáveis foram identificadas as frequências alélicas dos três polimorfismos C242T (C=65% e T=35%), -930 A/G (A=36% e G=64%) e -413 T/A (T=49% e A=51%) na população do Estado de Pernambuco. As frequências dos três polimorfismos foram semelhantes às observadas na população de afrodescendentes depositadas no banco de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Estes resultados correspondem ao esperado, uma vez que no Estado de Pernambuco há uma alta taxa de afrodescendentes.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

- Não foi observada associação entre os polimorfismos C242T, -930 A/G e o -413 T/A e a gravidade da doença, quando o índice geral foi utilizado como classificador da gravidade nos pacientes com anemia falciforme.
- O genótipo AA do polimorfismo -930 A/G presente no gene *CYBA* esteve associado com a gravidade da doença, quando o índice pediátrico foi utilizado como classificador da gravidade nas crianças com anemia falciforme.
- O genótipo CT do polimorfismo C242T presente no gene *CYBA* esteve associado à maior incidência de crises álgicas, sugerindo um novo marcador genético para os eventos de crises álgicas em pacientes com anemia falciforme.
- O genótipo TT do polimorfismo -413 T/A presente no gene *HMOX-1* esteve associado com níveis elevados de HbF, sendo possível sugerir um novo modular genético para os níveis de HbF nestes pacientes.
- Existe a necessidade de estudos em grupos maiores de pacientes para confirmar os resultados encontrados no presente trabalho, assim como a descoberta de novos preditores de gravidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutase: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007;74:324-329.
- Anoop P, Bevan DH, Chakrabarti S. Usefulness and limitations of Bayesian network model as a mortality risk assessment tool in sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2009;84(5):312-3.
- Antonarakis ES, Kazazian HH, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. *Human Genetics* 1985;69:1-14.
- Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *American Journal of Medicine*. 2003;115:721-728.
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem*. 1992;267:18148-18153.
- Ballas S. Sickle cell disease. *Clinical Management*. Bailliere's Clin. Haematol. 1998;11:185-214.
- Bryant CJ, Nguyen J, Bowlin PR, Kielbik MC, Bischof JC et al. Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood*. 2003;101:3953-3959.
- Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*. 2000;96:2451-2459.
- Buis CI, van der Steege G, Visser DS, Nolte IM, Hepkema BG, Nijsten M et al. Heme oxygenase-1 genotype of the donor is associated with graft survival after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2007;8(2):377-385.
- Bunn H & Forget : Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. United States of America, W.B. Saunders Company, 1986, p. 28-30.
- Bunn H & Forget : Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. United States of America, W.B. Saunders Company, 1986, p. 26.
- Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med*. 1997;337:762-9.
- Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, Gotto A, Marian AJ. A variant of p22(phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall, is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res*. 2000;86:391-5.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190:255-266.

- Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012;64(1):72-80.
- Cohen G. Oxidative stress in the nervous system. Sies, H., ed. *Oxidative stress*. New York: Academic. 1985;383-403.
- Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes: prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004;1657:1-22.
- Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem*. 1987;262:9895-9901.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18:655-673.
- Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1990;86:1729-37.
- Esterbauer H, Benedetti A, Lang J, Fulceri R, Fauler G, Comporti M. Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1986;876:154-166.
- Fertrin KY & Costa FF. Genomic polymorphism in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol*. 2010; 3(4):443-58.
- Flohé L, Beckmann R, Giertz H, Loschen G. Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation. Sies, H., ed. *Oxidative stress*. New York: Academic. 1985;405-437.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest*. 1982;47:412-426..
- Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J. Clin. Invest*. 2007;117(4):850-8.
- Gardemann A, Mages P, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis*. 1999;145:315-323.
- Gizi A, Papassotiriou I, Apostolakou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I et al. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol Dis*. 2011;46(3):220-5.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86:494-501.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* (2 nd edn). Clarendon press, Oxford. 1989.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is poisonous-na introduction to oxygen toxicity and free radicals, In: Free radicals in Biology and Medicine, Second edition, Clarendon Press–Oxford, United Kingdom, 1991.
- Halliwell B. The biochemistry of oxygen free radicals. In: Free radicals in tropical diseases, Aruoma, O. I. ed., Harwood Academic Publishers, United Kingdom. 1993;1-12.
- Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ. Res.* 1999;85:663-671.
- Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1982;1253-1259.
- Hebbel RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest.* 1997;100:S83-86.
- Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJJ. Damage to rat liver mitochondrial promoted by δ -aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta.*1991;1056:57-63.
- Infante J, Garcí'a-Gorostiaga I, Sánchez-Juana P, Sierra M, Martín-Gurpegui JL, Terrazas J et al. Synergistic effect of two oxidative stress-related genes (heme oxygenase-1 and GSK3b) on the risk of Parkinson's disease. *European Journal of Neurology.* 2010;17:760-762.
- Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1998;97:135-137.
- Ito D, Murata M, Watanabe K, Yoshida T, Saito I, Tanahashi N, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22phox gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke.* 2000;31:936-9.
- Izakovicova HL, Kanková K, Znojil V. Haplotype analysis of the NADPH oxidase p22 phox gene in patients with bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;148(1):73-80.
- Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 2002;100:879-887.
- Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest.* 2000;106:411-420.
- Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S, Nakanishi I. Heme oxygenase-1 deficiency:the first autopsy case. *Hum. Pathol.* 2002;33:125-130.
- Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respiratory Research.* 2001;2:280-285.

- Kokubo Y, Iwai N, Tago N. Association analysis between hypertension and CYBA, CLCNKB, and KCNMB1 functional polymorphisms in the Japanese population: the Suita Study. *Circ. J.* 2005;69:138-142.
- Li APA, Mincemoyer R, Satorius C, Epstein N, Finkel T, Quyyumi AA. Relationship of the C242T p22phox gene polymorphism to angiographic coronary artery disease and endothelial function. *Am J Med Genet.* 1999;86:57-61.
- Lim SC, Goh SK, Lai Y. Relationship between common functional polymorphisms of the p22phox gene (-930A>G and +242C>T) and nephropathy as a result of Type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet. Med.* 2006;23,1037-1041.
- Lux S.E, John KM, Karnovsky MJ. Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice in irreversibly sickled cells. *Journal of Clinical Investigation.* 1976;58:955-963.
- Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997;37:517-554.
- Maniatis T, Fritsch EF, Lauer J et al. The molecular genetics of human hemoglobins. *Ann Ver Genet* 1980;14:145-78.
- McCoubrey WK, Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* 1997;247:725-732.
- Moreno MU, San José G, Orbe J. Preliminary characterisation of the promoter of the human p22phox gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension. *FEBS Lett.* 2003;542:27-31.
- Morris CR, Suh JH, Haga W, Larkin S, Bland DA et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood.* 2008;111:402-410.
- Nasti S, Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Fabbi P, Polito L, Bacino L et al. C242T Polymorphism in CYBA gene (p22^{phox}) and risk of coronary artery disease in a population of Caucasian Italians. *Disease Markers.* 2006;22(3):167-73.
- Odenheimer DJ. Heterogeneity of sickle-cell anemia based on a prolife of hematological variables. *Am J Hum Genet* 1983;35:1224-1240.
- Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* 1998;91(1):288-294.
- Oliveira AR, Santos PC, Dias RG, Rodrigues MV, Sa CR, Mill JG, Junior WN et al. Association between the C242T polymorphism in the p22phox gene with arterial stiffness in the Brazilian population. *Physiol Genomics.* 2012;44(10):587-92.
- Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, Iwai N. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis.* 2004;173(2):315-319.

- Ono K, Mannami T, Iwai N. Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *Journal of Hypertension*. 2003;21:1497-1503.
- Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood*. 2000;96:314-320.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol*. 2003;24:449-455.
- Paixão MC, Cunha FMH, Januario JN, Viana MB, Lima JM. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of Hb S, Hb C, and Hb D in a pioneering population-based program of the newborn screening in Brazil. *Hemoglobin*. 2001;25(3):297-303.
- Pardini RS. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox active pro-oxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 1995;29(2):101-118.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N. Engl. J. Med*. 1994;330(23):1639-44.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639-1644.
- Powars D, Weiss JN, Chan LS, Schroeder WA. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood*. 1984;63(4):921-926.
- Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukocyte Biol*. 2004;76:760-781.
- Repka T, Hebbel PR. Hydroxyl Radical Formation by Sickle Erythrocyte Membranes: Role of Pathologic Iron Deposits and Cytoplasmic Reducing Agents. *Blood*. 1991;78(10):2753-8.
- Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids*. 1987;44:175-189.
- Rublevskaya I, Maines MD. Interaction of Fe-protoporphyrin IX and heme analogues with purified recombinant heme oxygenase-2, the constitutive isozyme of the brain and testes. *J. Biol.Chem*. 1994;269:26390-26395.
- Rücker M, Schäfer T, Roesken F, Spitzer WJ, Bauer M, Menger MD. Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress conditioning-induced heat-shock protein 32. *Surgery*. 2001;129:292-301.
- Rueda B, Oliver J, Robledo G, Miguel A, López-Nevot, Balsa A et al. HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3953-3958.

- Sales ML, Ferreira MC, Leme Jr. Non-effect of p22-phox -930A/G polymorphism on end-organ damage in Brazilian hypertensive patients. *J. Hum. Hypertens.* 2007;2:504–506.
- Salzano FM. Incidence, effects and management of sickle cell disease in Brazil. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1986;7:240-4.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY). Cold Spring Harbor Press. 1989;17-19.
- San José G, Moreno MU, Oliván S. Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension.* 2004;44:163-169.
- Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-448.
- Sarnaik SA, Ballas SK. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. *Am. J. Hematol.* 2001;67:179-182.
- Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Tucunduva AC, Mill JG, Costa FO, Krieger JE et al. CYBA C242T polymorphism is associated with obesity and diabetes mellitus in Brazilian hypertensive patients. *Diabet Med.* 2012;29(7):55-61.
- Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood.* 2007;110:2727-2735.
- Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat. Genet.* 2005;37:435-440.
- Serjeant GR. A doença da célula falciforme. *Anais Nestlé.* 1999;58:11-22.
- Serjeant GR. *Sickle Cell Disease.* 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press; 1992.
- Shimo-Nakanishia Y, Hasebeb T, Suzukia A, Mochizukia H, Nomiya T, Tanakac Y et al. Functional effects of NAD(P)H oxidase p22phox C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction. *Atherosclerosis.* 2004;175:109-15.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem.* 1986;25:1058-1071.
- Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J et al. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J. Immunol.* 2004;172:3553-3563.
- Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Bailliere's Clin. Haematol.* 1998;11:163-84.
- Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 2001;137:398-407.

- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griending KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:23317-21.
- Vercellotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:207-213.
- Verhoeven AJ, Bolscher BGJM, Roos D. The superoxide-generating enzyme in phagocytes: physiology, protein composition, and mechanism of activation. In: *Membrane lipid oxidation*. Vigo-Pelfrey C, editor. Boston: CRC press. 1991:42-59.
- Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 2001;98:1802-1811.
- Wagener FA, Silva JL, Farley T, Witte T, Kappas A, Abraham NG. Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999;291:416-423.
- Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* 2003;55:551-571.
- Wei D, Zsuzsanna A, Reena R, Xiaoling Z, Qishen P: Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(11):1909-1921.
- Whitehead AS, FitzGerald GA. Twenty-first century phox: not yet ready for widespread screening. *Circulation.* 2001;103:7-9.
- Xandra W. van den T, Johanna H. van der L, Harriët H, Marjolein P, Karin F. Development and validation of a pediatric severity index for sickle cell patients. *Am J Hematology.* 2010; 85:746-751.
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 1999;103:129-135.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Oliván S, Ros R, Montoya A et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on superoxide production in essential hypertension. *J Hypertens (Suppl 2).* 2004;22: S346.

ANEXOS

ANEXO 1

Extração de DNA de sangue periférico

- Sangue colhido em tudo com EDTA (tampa rocha)
 - Estabilizar sangue à temperatura ambiente
 - Ligar estufa, fixando temperatura em 37 °C
1. Centrifugar os tubos com as amostras de sangue por 10 minutos a 2500 rpm para separação do plasma, leucócitos e hemácias.
 2. Remover com pipeta Pasteur (de plástico descartável) os leucócitos (camada intermediária entre o plasma e as hemácias) e transferir para um tubo de polipropileno de 15 mL.
 3. Adicionar a este tubo tampão RSB 1X (Tris-HCl 5 mM pH 7,6; KCl 15mM; MgCl 10 mM) até completar o volume final de 11 mL.
 4. Adicionar 60 µL de NONIDET-P40 (Affymetrix/USB products, Cleveland, OH, EUA).
 5. Homogeneizar por 10 minutos e centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
 6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 0,5 mL de tampão RSB 1X.
 7. Adicionar 3 mL de SDS para sangue (RSB 1X; NaCl 0,4M; SDS 0,5%; EDTA 20 mM; H₂O q.s.p. 500,0 mL) e homogeneizar por 10minuto.
 8. Adicionar 80 µL de proteinase K (numa concentração final de 100 µL/mL).
 9. Incubar por aproximadamente 18 horas à 37°C.

10. Adicionar 3,0 mL de fenol saturado.
11. Homogeneizar por 10 minutos e centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
12. Transferir a fase aquosa (porção superior da mistura) para outro tubo falcon, com pipeta Pasteur descartável e descartar a porção inferior.
13. Adicionar 1,5 mL de fenol saturado e 1,5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (1:24, v:v).
14. Homogeneizar por 10 minutos e centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
15. Remover e descartar a porção inferior do tubo.
16. Adicionar 3,0 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (1:24, v:v).
17. Homogeneizar por 10 minutos e centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
18. Adicionar 6,0 mL de etanol absoluto gelado seguido de agitação leve.
19. Recuperar o DNA com haste de vidro esterilizada e ressuspender em 200 a 250 μ L de TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

ANEXO 2

Purificação da reação de sequenciamento

- 1.** Adicionar a cada amostra 80 μL de etanol 80%.
- 2.** Centrifugar a 4000 rpm por 45 minutos.
- 3.** Descartar o sobrenadante.
- 4.** Adicionar a cada amostra 150 μL de etanol 70%.
- 5.** Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos a 4000 rpm.
- 6.** Descartar o sobrenadante.
- 7.** Secar a placa com as amostras em termociclador por 3 minutos a 64 $^{\circ}\text{C}$.
- 8.** Armazenar a -20 $^{\circ}\text{C}$ até ser realizado o sequenciamento.

ANEXO 3

As variáveis laboratoriais e seus valores de referência utilizados pelo índice geral, proposto por Sebastiani et al, em 2007, para realizar a atribuição dos escores de gravidade nos pacientes com anemia falciforme.

Bilirribina (mg/dL)

- < 1.3
- 1.3 - 3.4
- > 3.4

LDH (U/L)

- < 300
- 300 - 600
- > 600

MCV (fL)

- < 80
- 80 - 98
- > 98

Contagem de Reticulócitos (%)

- < 4.8
- 4.8 - 13
- > 13

Contagem WBC ($10^9/L$)

- < 10.8
- 10.8 – 13.5
- > 13.5

ANEXO 4



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 15/02/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1237/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0968.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE DO POLIMORFISMO EM GENES ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO E ASSOCIAÇÃO COM A SEVERIDADE DA DOENÇA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Gislene Pereira Gil

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/12/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/02/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Analisar quatro polimorfismos em genes envolvidos na via de estresse oxidativo, sendo C242T e -930 A/G no gene CYBA e -413 A/T e repetições GTn no gene HO-1, em pacientes com anemia falciforme e correlaciona-los com a severidade da doença.

III - SUMÁRIO

Serão avaliados 200 pacientes com anemia falciforme proveniente do Hemocentro e do Hemope. Será coletada uma amostra de sangue para a análise molecular

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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 (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

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 (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – 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 projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)



Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

ANEXO 5

 <p>Fundação HEMOPE Recife</p>	<p>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p> <p>Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com</p>	 <p>GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO Secretaria de Saúde do Estado de PE</p>
--	--	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL : N°. 035/2010

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme
Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra, Ph.D.
Identidade: 5867375 **CPF:** 987.061.525-20 **Telefone:** 81 – 3182-4711
Endereço: Rua. Antonio Celso Uchoa Cavalcanti- Graças- Recife – PE – CEP: 52050-002
Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE
Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade clínica da anemia falciforme.
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de $\alpha_2^{3,7kb}$ talassemia e da triplicação do α ($\alpha\alpha\alpha$) influenciando nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos das Haplótipos β^S com o episódio de priapismo e acidente vascular cerebral; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene da eNOS (T-786C) no desenvolvimento do priapismo em pacientes com anemia falciforme; Investigar se a associação de SNPs no gene Klotho podem ser um fator de risco nas complicações vasculares, como priapismo, em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene TNF- α (-308) no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs2228088 (T- >G), localizado na região codificadora do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs3093665 (C- >A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre pacientes portadores de anemia falciforme com e sem priapismo; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre os pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVC; Compreender melhor a heterogeneidade clínica da doença falciforme nas complicações do sistema nervoso central e Compreender melhor a heterogeneidade da doença falciforme nas complicações clínicas do priapismo.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer n°. 035/2010, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o 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-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 20/10/2010


Ana Lúcia de Sena
Coordenadora - Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE

ANEXO 6

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (resolução 196/96; 340/04; 347/05)

Pesquisa: Moduladores Genéticos das Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme.

Pesquisadores: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra e Dr. Aderson da Silva Araújo (PhD). **Local:** Fundação Hemope / UFPE.

A finalidade deste é trazer informações para o paciente sobre o estudo “Moduladores Genéticos das Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme”. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo.

Nós verificamos que a anemia falciforme causa morbidade provocando dores, o que pode estar interferindo com suas atividades do dia a dia e gostaríamos que você doasse 1 tubo de sangue, obtido por punção venosa usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, não havendo qualquer outro risco em participar da pesquisa. O material desse estudo será armazenado no HEMOPE e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e CONEP.

O paciente tem direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Como condição de participação nesta pesquisa, o paciente permite acesso aos dados obtidos durante o estudo, aos pesquisadores envolvidos neste estudo e aos membros da Comissão de Ética responsáveis pela análise do projeto. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações. A participação neste estudo é voluntária e o paciente pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem prejuízos ao seu tratamento. O pesquisador tem o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento que julgar necessário. Além disso, o paciente tem direito a qualquer esclarecimento sobre o estudo mesmo durante o seu decorrer.

Moduladores Genéticos das Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo “Moduladores Genéticos das Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme”. Autorizo a coleta de 1 tubo de 5ml contendo EDTA que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

1- Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo da continuidade do meu tratamento.

Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.

2- Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.

3- Garantia de acesso ao responsável pelo estudo e ao respectivo comitê de ética institucional, quando necessário.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação dos dados e ao armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Prof. Dr. Marcos André (81) 3182-4711/9138-9556

Dr. Aderson da Silva Araújo (81) 9976-5136

Consentimento para participação no estudo:

Paciente

Pesquisador responsável

Testemunha

