

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Diego Arruda Falcão

**Investigação de polimorfismos em genes que podem estar
relacionados ao desenvolvimento de úlcera de membros
inferiores em pacientes com anemia falciforme**

**Recife - PE,
Março de 2014**

Diego Arruda Falcão

Investigação de polimorfismos em genes que podem estar relacionados ao desenvolvimento de úlcera de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientadores: Dr. Aderson da Silva Araújo

Prof. Dr. Kleber Yotsumoto Fertrin

Recife - PE, Março de 2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Falcão, Diego Arruda

Investigação de polimorfismos em genes que podem estar relacionados ao desenvolvimento de úlcera de membros inferiores com anemia falciforme/ Recife: O Autor, 2014.

72 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientadores: Anderson da Silva Araújo e Kleber

Yotsumoto Fertrin

Mestrado (dissertação) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

- 1. Anemia falciforme 2. Polimorfismo (genética) I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador) II. Araújo, Anderson da Silva (coorientador) III. Fertrin, Kleber Yotsumoto (coorientador) IV. Título**

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 183

Diego Arruda Falcão

Investigação de polimorfismos em genes que podem estar relacionados ao desenvolvimento de úlcera de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme

Aprovado em 10/03/2014

Banca Examinadora:

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Leuridan Cavalcante Torres
Instituto Materno Infantil de Pernambuco

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, pois sem ele nada disso seria possível;

A Universidade Federal de Pernambuco, pelo espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa, e a Fundação HEMOPE, pelas amostras fornecidas, bem como toda sua infra-estrutura, que permitiu a conclusão do projeto;

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido durante desenvolvimento do projeto;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, por ter aberto todos os caminhos possíveis, e pela amizade;

À todos os médicos do Hemope, em especial à Dr. Aderson pela ajuda no encaminhamento dos pacientes;

Ao Prof. Dr. Antônio Roberto pela disponibilidade, e ajuda sempre que possível, e também pela amizade construída.

À todos do laboratório de biologia molecular de vírus – UPE, em especial à Taciana Mendonça e Luydson pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho;

A todos do Laboratório de Hemoglobinopatias, em especial a Prof. Msc Betânia Lucena por sempre estar disposta a contribuir da melhor forma;

À todos os colegas de laboratório ;

À todos do laboratório de pesquisa translacional – IMIP, em especial à Leuridan Torres e à Marina Cadena pela ajuda na fase final do trabalho;

À todos os meus amigos, que estiveram presentes nessa jornada, em especial a Igor Domingos;

Aos meus pais José Wilson Barros Falcão e Evani Fabiana Arruda Falcão por toda paciência e esforço pra sempre me oferecer o melhor;

À minha namorada Natasha Porto por estar presente em todos os momentos, sejam bons ou ruins, e por me apoiar sempre;

E por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação profissional e pessoal

Os meus sinceros agradecimentos

Resumo

Introdução: A anemia falciforme (AF) é a anemia hemolítica mais comum no Brasil. É uma doença que se origina de uma mutação pontual e sua fisiopatologia é caracterizada pela polimerização da HbS, levando a formação de uma hemácia em forma de foice. Essa hemácia falcizada leva à hemólise e vaso-oclusão, que são responsáveis pelas principais manifestações clínicas da doença, como as úlceras de membros inferiores. As úlceras afetam consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes com AF, e apesar de não apresentarem uma causa muito bem definida, variantes polimórficas de alguns genes, podem influenciar no seu desenvolvimento.

Objetivo: Esclarecer se fatores genéticos como os haplótipos β^S , a talassemia α , e polimorfismos nos genes *eNOS*, *Klotho*, *TEK*, *TGF- β* e *BMP6* estão relacionados com o desenvolvimento das úlceras de membros inferiores na anemia falciforme em nossa população de pacientes acompanhadas na Fundação HEMOPE. **Metodologia:** A amostra foi constituída de 100 pacientes casos e 175 pacientes controles. Utilizamos como critérios de inclusão para os casos: pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS) não relacionados, acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação Hemope (HEMOPE), Recife – PE com histórico atual ou prévio de úlcera de membros inferiores. O grupo de controles foi constituído de portadores de anemia falciforme acima de 18 anos que nunca apresentaram úlceras. Análise molecular foi feita por PCR-RFLP, gap PCR e PCR em tempo real. **Resultados:** O polimorfismo do gene *TGF β 3* mostrou diferença estatística ($p=0,027$) quando comparamos os dois grupos estudados, mostrando que a homozigose para esse polimorfismo, pode aumentar o risco de desenvolvimento de úlceras de membros inferiores. Não houve diferença estatística entre os outros marcadores moleculares. **Conclusões:** De todos os marcadores genéticos em nosso estudo, apenas o polimorfismo do gene *TGF β 3* apresentou influência reprodutível como modulador genéticos para a prevalência de úlceras de membros inferiores em nossa população de pacientes com AF.

Apoio – CNPq

Palavras-chave: anemia falciforme; polimorfismos; úlceras de membros inferiores

Abstract

Introduction: Sickle cell anemia (SCA), the most common hemolytic anemia in Brazil, is characterized by HbS polymerization, leading to the formation of sickle-shaped red blood cells. These sickle erythrocyte promotes hemolysis and vaso-occlusion, being responsible for SCA main clinical manifestations, such as leg ulcers. Leg ulcers greatly affect the life quality from SCA patients, and despite not having a well defined cause, genetic polymorphisms may influence its development. **Objective:** Clarify the role from the β s haplotypes, α thalassemia and polymorphisms in eNOS, Klotho, TEK, TGF- β and BMP6 genes on leg ulcers developments in our SCA population followed at HEMOPE Foundation. **Methods:** 275 unrelated Sickle Cell Anemia (SCA) patients, followed at Hospital Hematology Hemope (HEMOPE), Recife - PE, were included in this study, and, according the leg ulcers presence, were divided in two groups. 100 SCA patients presenting current or prior history of leg ulcers were called "Leg Ulcers Positive". 175 patients above 18 years with no history of leg ulcers were called "Leg Ulcers Negative". Molecular analysis was performed by PCR-RFLP, gap PCR and real-time PCR. **Results:** When comparing the two groups, only homozygosis for the *TGF β 3* polymorphism presented statistical difference ($p = 0,027$), revealing an increasing risk for leg ulcers development. Regarding the others molecular markers, no association were found. **Conclusion:** From all genetic markers evaluated on our study, only the *TGF β 3* polymorphism presented reproducible influence as genetic modulator for leg ulcers prevalence in our SCA population.

Acknowledgments: Financial Support by CNPq.

Key-words: sickle cell anemia; polymorphisms, leg ulcers

Lista de ilustrações

Figura 1: Fisiopatologia da anemia falciforme. Muta��o na 6 ^a posi��o no gene da globina β , levando a forma��o de uma hemoglobina an��mala, a HbS, que sofre uma polimeriza��o em condi��es desoxigenadas. O polímero de HbS danifica o eritrócito, diminuindo sua vida útil (hemólise), aumentando o consumo de óxido nítrico. As hemácias falcizadas também promovem uma vasocclus��o.....	5
Figura 2: Fotografia representativa da úlcera de membros inferiores, com comprometimento do maléolo medial direito.....	8
Figura 3: Redu��o da disponibilidade do ON devido �� hemólise intravascular. Hemoglobina plasmática livre consome o ON, produzindo metahemoglobina e nitrato bio-inativo (A). Arginase plasmática consome L-arginase, diminuindo sua disponibilidade para produ��o de ON (B). Espécies reativas de oxigênio consomem o ON, gerando radicais de oxigênio (C). Na AF, a diminui��o da disponibilidade de ON está associada com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna e AVC isqu��mico.....	15
Figura 4. Esquema da via de sinaliza��o SMAD dependente ativada por BMPs.....	20
Figura 5: <i>Cluster</i> β mostrando os sítios polimórficos estudados na determina��o dos haplótipos β^S	28

Lista de Tabelas

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> β : localização referente ao <i>cluster</i> β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).....	28
Tabela 2: Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	29
Tabela 3: Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	30
Tabela 4: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.....	31
Tabela 5: Sequências dos <i>primers</i> para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$ e do $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7Kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).....	32
Tabela 6: Composição da reação para amplificação da região polimórfica T-786C do gene da eNOS.....	33
Tabela 7: Condições da reação para amplificação do polimorfismo na região promotora do gene da eNOS (T-786C).....	33
Tabela 8: <i>Primers</i> e Enzima para o estudo do polimorfismo da eNOS (T-786C).....	34
Tabela 9: Comparação dos dados hematológicos dos pacientes portadores de AF com e sem úlcera.....	36
Tabela 10: Combinações haplotípicas do gene β^S nos grupos casos e controles.....	37
Tabela 11: Comparação entre o haplótipo CAR/CAR e os demais haplótipos β^S nos grupos casos e controles.....	37
Tabela 12: Resultados da pesquisa da deleção alfa talassêmica ($-\alpha^{3,7kb}$) em nossa população de pacientes.....	38
Tabela 13: Pesquisa do Polimorfismo eNOS T-786C nos grupos de casos e controles estudados.....	38
Tabela 14: Pesquisa do polimorfismo rs685417 do gene <i>Klotho</i> nos casos e controles estudados.....	39

Tabela 15: Pesquisa do polimorfismo rs516306 do gene <i>Klotho</i> nos casos e controles estudados.....	39
Tabela 16: Pesquisa do polimorfismo rs270393 do gene <i>BMP6</i> nos casos e controles estudados.....	40
Tabela 17: Pesquisa do polimorfismo do gene <i>TEK</i> nos casos e controles estudados.....	40
Tabela 18: Pesquisa do polimorfismo rs1019856 do gene <i>TGFβR2</i> nos casos e controles estudados.....	41
Tabela 19: Pesquisa do polimorfismo rs203831 do gene <i>TGFβR3</i> nos casos e controles estudados.....	41
Tabela 20: Pesquisa do polimorfismo rs203831 do gene <i>TGFβR3</i> nos casos e controles estudados, analisando os três genótipos separadamente.....	42

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
Γ	Gama
Ψ	Psi
$\alpha^{3.7Kb}$	Deleção alfa 3.7Kb
$\alpha\alpha$	Genótipo alfa normal
ARB	Árabe Indiano
AST	Aspartato amino tranferase
ATP	Atípico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
β^S	Globina beta falciforme
BAN	Bantu
BEM	Benin
BI	Bilirrubina Indireta
<i>BMP-6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6
BT	Bilirrubina Total
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAM	Camarões
CAR	República Central Africana
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

Cgmp	Guanosina monofosfato cíclica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dH ₂ O	Água Deionizada
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
<i>Enos</i>	Óxido nítrico sintase endotelial
FOXO	Forkhead Box O
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HCl	Ácido Clorídrico
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	High-performance liquid chromatography
Ht	Hematócrito
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio

<i>KL</i>	<i>Klotho</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
M	Molar
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
Mm	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
Ng	Nanograma
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ON	Óxido nítrico
P	Significância
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Ph	Potencial Hidrogeniônico
Ret	Reticulócito
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio

Rpm	Rotações por minuto
SAUDI	Índia – Arábia Saudita
SEM	Senegal
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD2	Super Óxido Dismutase 2
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TEK</i>	Tyrosine Kinase Endothelial.
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
U	Unidade
UNILABE	Unidade de Laboratórios Especializados
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VCM	Volume Corpuscular Médio
μL	Microlitro
μM	Micromolar
X	Número de vezes
°C	Graus Célsius
'	Minuto
"	Segundo
>	Maior que

Sumário

Resumo	IV
Abstract	V
Lista de ilustrações.....	VI
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	VIII
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Anemia Falciforme.....	3
2.1.2. Origem.....	3
2.1.3. Fisiopatologia	4
2.1.4. Manifestações Clínicas.....	7
2.2. Úlceras de membros inferiores.....	7
2.2.1. Classificação	8
2.2.2. Tratamento e Prevenção.....	9
2.2.3. Fatores Genéticos	10
2.3. Marcadores Moleculares	10
2.3.1. Haplótipos β^S	10
2.3.2. Talassemia α	11
2.3.3. eNOS.....	13
2.3.4. <i>Klotho</i>	16
2.3.5. <i>BMP 6</i>	18
2.3.6. <i>TEK</i>	20
2.3.7. <i>TGF-β</i>	21
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. Material e Métodos.....	24
4.1. Casuística	24
4.2. Desenho de estudo	24
4.3. Aspectos éticos da pesquisa	25
4.4. Coleta de material.....	25
4.5. Análise Hematológica e Clínica.....	25
4.6. Análise Molecular.....	26
4.6.1. Extração de DNA.....	26
4.6.2. Reação de Amplificação.....	27
4.6.3. Pesquisa de Polimorfismos.....	27
4.6.3.2. Determinação dos Haplótipos β^S	27
4.6.3.3. Pesquisa do Genótipo α	31
4.6.3.4. Pesquisa do Polimorfismo eNOS T-786C.....	32
4.6.3.5. Pesquisa dos Polimorfismos dos Genes <i>Klotho</i> , <i>TEK</i> , <i>TGF-β</i> e <i>BMP6</i>	34
4.7. Análise Estatística	35
5. Resultados.....	35

5.1 Caracterização da amostra	35
5.2. Análise Laboratorial.....	35
5.3. Pesquisa dos Polimorfismos.....	36
5.3.1. Haplótipos do gene β^S	36
5.3.2. Deleção $\alpha 3.7Kb$	37
5.3.3. eNOS	38
5.3.4. <i>Klotho</i>	39
5.3.5. <i>BMP6</i>	39
5.3.6. <i>TEK</i>	40
5.3.7. <i>TGF-β</i>	40
6. Discussão	42
6.1. Análise Laboratorial.....	42
6.2. Haplótipos do gene β^S	43
6.3. Deleção $\alpha^{3.7Kb}$	44
6.4. eNOS	46
6.5. <i>Klotho</i> , <i>BMP6</i> , <i>TEK</i> e <i>TGF-β</i>	46
7. Conclusões.....	48
8.Referências Bibliográficas	48
Apêndice	54
Anexo 1	56
Anexo 2: Artigo Não Relacionado à Dissertação	57
Currículo lattes atualizado.....	67

1. Introdução

A anemia falciforme (AF) é causada por uma mutação pontual no gene da globina β (*HBB*), devido à substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição do gene da cadeia β globínica (β^6 GAG→GTG; glu⁶→val⁶), levando a formação de uma hemoglobina (Hb) anormal, a HbS. A AF é caracterizada por uma anemia hemolítica crônica e por episódios recorrentes de vaso-oclusão, a qual leva a complicações multissistêmicas. Em condições específicas, como baixas concentrações de oxigênio, diminuição do pH e baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF), a HbS forma um polímero que se deposita na membrana das hemácias, modificando a forma dos eritrócitos, tornando-os falciformes. As células rígidas, conhecidas como células em forma de foice, são responsáveis pela oclusão vascular, hemólise, episódios de dor e lesão de órgãos alvos que representam os fenômenos principais dessa doença.

Acredita-se que o processo de vaso-oclusão compreende múltiplos passos, e é o resultado de um complexo cenário envolvendo interações de diferentes tipos celulares, incluindo células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, leucócitos ativados, células endoteliais anormalmente ativadas, plaquetas e proteínas plasmáticas. Vaso-oclusões recorrentes, processos de isquemia-reperfusão e consequente ativação do endotélio vascular e injúria, induzem a contínuas respostas inflamatórias na anemia falciforme, que se propagam por níveis elevados de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e estresse oxidativo.

Uma das características marcantes da doença falciforme é a variabilidade de suas manifestações clínicas, e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas, variando de formas quase assintomáticas até clinicamente graves, responsáveis por alta mortalidade na infância.

As manifestações clínicas da AF compreendem as mais diversas formas, sendo as principais as crises álgicas, crises hemolíticas, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda, seqüestro esplênico, necrose asséptica de fêmur e úmero, retinopatia; insuficiência renal crônica, priapismo, úlceras de membros inferiores entre outros.

A úlcera de membros inferiores é uma complicação crônica, bastante freqüente e dolorosa na anemia falciforme. Os fatores que predis põem os pacientes com anemia falciforme a essa complicação não estão bem estabelecidos, embora seu desenvolvimento sugira o papel da hemólise. Existe, portanto, a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precocemente possível na nossa população, de forma que medidas preventivas poderão ser tomadas, evitando que os pacientes sofram complicações futuras e intervenções cirúrgicas.

Diversas linhas de pesquisa sugerem que anemia falciforme pode ser modulada por diversos determinantes genéticos. Esses incluem os haplótipos do gene β^S e a talassemia- α e polimorfismos em vários genes.

Considerando que pacientes com anemia falciforme apresentam muitas vezes quadros clínicos variados que dificultam a tomada de decisão terapêutica e de cuidados de saúde em geral, a identificação de padrões biológicos, que influenciem na modulação fenotípica, é muito útil e de grande impacto na melhoria da sobrevida e da qualidade de vida dos doentes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se os haplótipos do gene β^S , talassemia- α , e polimorfismos nos genes *Klotho*, *TEK*, *TGF- β* , *e-NOS* e *BMP6*, atuam como fatores genéticos associados à patogênese da AF sendo moduladores no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores em nossa população de pacientes.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Anemia Falciforme

2.1.2. Origem

A anemia falciforme (AF) é uma das doenças hereditárias mais comuns no mundo, onde 2% da população mundial apresentam a mutação, além de nascer entre 300.000-400.000 crianças falciformes a cada ano (RUSANOVA et al., 2011). No Brasil, estima-se que 5-6% da população seja portadora do traço falciforme e que, a cada ano, nascem entre 700-1000 crianças portadoras da AF (LYRA et al. 2005).

No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 1400 nasce com a doença falciforme (CANÇADO & JESUS, 2007). Bandeira e cols. (1999), ao realizar uma triagem em sangue de cordão umbilical, encontraram uma frequência de 5,1% recém-nascidos portadores do traço falciforme no estado de Pernambuco.

A AF é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente entre afro-descendentes (CANÇADO & JESUS, 2007). A causa da doença é uma mutação de ponto ($GAG \rightarrow GTG$) no gene da globina beta da hemoglobina (Hb), originando uma Hb anormal, a Hb S (HbS), ao invés da Hb normal denominada Hb A (HbA). Essa mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia β , e conseqüentemente ocorre modificação físico-química na molécula da HbA (BALLAS et al., 1996). Quando desoxigenada, a HbS polimeriza, formando estruturas filamentosas (polímeros de HbS desoxigenada) que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falciformes. As células rígidas, conhecidas como células em forma de foice, são responsáveis pela oclusão

vascular, hemólise, episódios de dor e lesão de órgãos alvos que representam os fenômenos principais dessa doença (NAGEL et al., 2001; STEINBERG, 1999).

2.1.3. Fisiopatologia

Sob hipóxia, interações hidrofóbicas acontecem entre as moléculas de HbS, resultando na polimerização da hemoglobina e alteração da forma eritróide. A falcização altera as propriedades da membrana celular, reduzindo sua flexibilidade e promovendo uma maior aderência ao endotélio vascular (ZHOU et al., 2011).

A HbS demonstra propriedades bioquímicas peculiares, polimerizando-se quando desoxigenada. Estudos de cinética da polimerização da HbS demonstraram que a formação do polímero é de ordem exponencial em função da quantidade de hemoglobina, demonstrando o papel crucial da concentração de HbS no fenômeno da falcização (DE FRANCESCHI et al., 2011).

A polimerização da HbS está associada com uma redução de água e íons celulares (desidratação), aumento da densidade do eritrócito, com conseqüente aceleração da formação do polímero. Estudos demonstraram que o eritrócito desidratado tem um papel fundamental nas manifestações clínicas agudas e crônicas da AF, em que a falcização intravascular promove uma vasoclusão, impedindo o fluxo sanguíneo (DE FRANCESCHI et al. 2011).

As hemácias falcizadas também apresentam uma perda assimétrica de fosfolípidios, que externam a fosfatidilserina. Estudos acreditam que a fosfatidilserina tem um papel significativo na ativação da coagulação, além de promover a ativação dos macrófagos (GAYEN BETAL & SETTY, 2008).

O acúmulo de polímeros de HbS dentro das hemácias falcizadas promove uma lesão celular nesses eritrócitos. Em larga escala, esses eritrócitos danificados

promovem efeitos hemolíticos e vasoclusivos, caracterizando o fenótipo principal da AF (STEINBERG, 2008) (Figura 1).

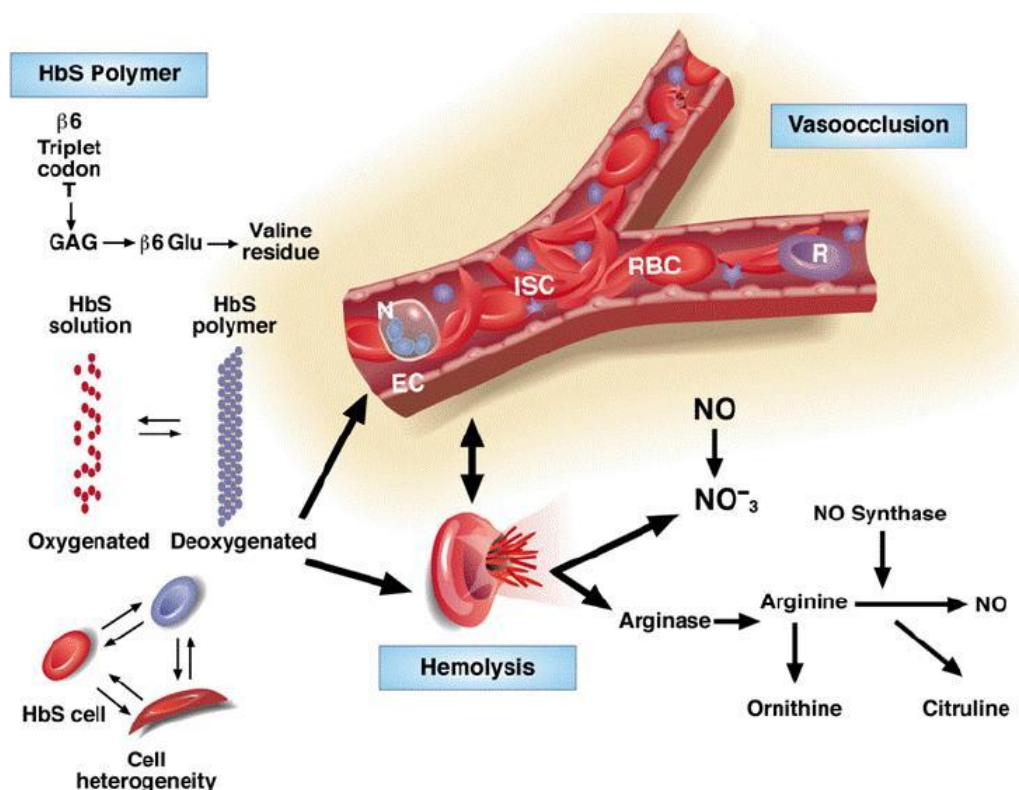


Figura 1: Fisiopatologia da anemia falciforme. Mutação na 6ª posição no gene da globina β, levando a formação de uma hemoglobina anômala, a HbS, que sofre uma polimerização em condições desoxigenadas. O polímero de HbS danifica o eritrócito, diminuindo sua vida útil (hemólise), aumentando o consumo de óxido nítrico. As hemácias falcizadas também promovem uma vasocclusão (Steinberg 2008).

Pacientes falciformes, por desenvolverem hemácias falcizadas que apresentam um tempo de vida mais curto, cursam com um elevado grau de hemólise. Devido à hemólise crônica, os pacientes portadores de AF apresentam altos níveis de hemoglobina plasmática que sequestram o óxido nítrico, diminuindo sua disponibilidade, levando ao desenvolvimento de algumas manifestações clínicas da doença falciforme (STEINBERG, 2008).

Na AF, a hemólise ocorre extravascularmente através de um reconhecimento das hemácias danificadas por células do sistema reticuloendotelial. Entretanto, a hemólise

também pode ocorrer também dentro dos vasos, com os níveis podendo atingir até 30% da hemólise total de um paciente falciforme (STEINBERG, 2008).

Outro importante fator envolvido na fisiopatologia da AF é a vaso-oclusão. Acredita-se que o processo de vaso-oclusão compreende múltiplos passos, e é o resultado de um complexo cenário envolvendo interações de diferentes tipos celulares, incluindo células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, leucócitos ativados, células endoteliais anormalmente ativadas (SOLOVEY et al., 1997), plaquetas e proteínas plasmáticas (CHIANG & FRENETTE, 2005; DE FRANCESCHI & CORROCHER, 2004). A fisiopatologia da anemia falciforme está centralizada na capacidade de polimerização da hemoglobina S desoxigenada, mas outros mecanismos fisiológicos têm sido importantes na determinação da frequência de complicações da anemia falciforme, tais como: alterações estruturais e funcionais da membrana eritrocitária, concentração de Hb fetal, co-hereditariedade com a talassemia alfa (α) (POWARS et al. 1990; NAGEL 1991; NAGEL et al. 2001).

O fenômeno de falcização pode ser revertido quando níveis elevados de oxigênio são novamente atingidos, sendo que falcizações sucessivas alteram a estrutura da membrana da hemácia, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas. Hemácias falcizadas, por apresentarem um tempo de vida curto e sofrerem interação com células endoteliais, leucócitos, plaquetas e outros componentes do plasma, promovem as manifestações vasclusivas da doença falciforme (CHANG et al. 1997; NOLAN et al. 2005).

2.1.4. Manifestações Clínicas

A ocorrência de vaso-oclusões, principalmente em pequenos vasos, juntamente com a hemólise representam os eventos fisiopatológicos determinantes na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com AF, tais como crises álgidas; crises hemolíticas; síndrome torácica aguda; seqüestro esplênico; necrose asséptica de fêmur e úmero; retinopatia; insuficiência renal crônica; autoesplectomia; priapismo, acidente vascular cerebral e úlceras de membros inferiores (BALLAS et al., 1996; CONRAN et al., 2009).

2.2. Úlceras de membros inferiores

A úlcera de membros inferiores é a complicação cutânea mais frequente na doença falciforme, atingindo principalmente a região dos maléolos medial e lateral e a região frontal da perna e calcanhares, e ocorre devido a vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos, apresentando cicatrização lenta e alta taxa de recorrência (SERJEANT et al., 2005; PALADINO, 2007; BOWERS, 2013). Ocorre entre 8% a 10% dos pacientes falciformes, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A variabilidade é determinada por diferenças genéticas e condições ambientais. Ainda, é predominante no sexo masculino acima dos 10 anos de idade (STEINBERG, 2008).

As úlceras são bastante dolorosas e geralmente aparecem em consequência a pequenos traumas e picadas de insetos, mas podem até mesmo aparecer espontaneamente. A lesão pode ser agravada pela colonização de bactérias na base das lesões, e em alguns, o debridamento cirúrgico, o retalho miocutâneo por microcirurgia e o enxerto de pele parcial do próprio paciente podem ser realizados, evidenciando a gravidade dessa manifestação clínica e o modo como ela interfere na qualidade de vida dos pacientes falciformes (PALADINO, 2007).

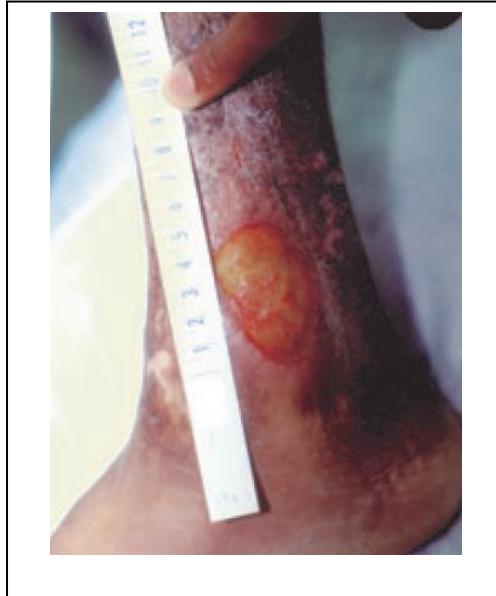


Figura 2: Fotografia representativa da úlcera de membros inferiores, com comprometimento do maléolo medial direito (McMahon, et al 2010).

2.2.1. Classificação

Apesar de se tratar de uma manifestação clínica de origem multi fatorial, em que a patogênese não está completamente esclarecida, foram estabelecidos índices de gravidade baseados no tamanho, profundidade e duração (MINITTI et al., 2010). O estadiamento com relação à extensão dos danos pode ser proposto da seguinte maneira:

- Fase 1: Eritema com pele intacta, em que se anuncia a ulceração da pele com sintomas, tais como, descoloração da pele, calor, edema, endurecimento da região;
- Fase 2: Perda parcial dos componentes da pele com envolvimento principal da epiderme e derme;
- Fase 3: Comprometimento de todas as camadas da pele chegando a necrose do tecido subcutâneo, em que a úlcera, normalmente, se apresenta sob a forma de cratera;

- Fase 4: Perda completa da espessura da pele com destruição extendendo-se até o músculo, ossos ou estruturas de suporte, como tendões, em que há necrose tecidual.

De acordo com sua duração, as úlceras podem ser classificadas em agudas ou crônicas. Entretanto não há uma definição consensual que defina um período específico para a cronicidade, aceitando-se, de modo geral, aguda quando há cicatrização em menos de um mês, e crônica com duração acima de 6 meses, não sendo rara a permanência desta por vários anos em fenômeno contínuo de cicatrização e reabertura (MINITTI et al., 2010b).

2.2.2. Tratamento e Prevenção

O tratamento das úlceras consiste, sumariamente, dos cuidados com as feridas abertas, sendo feito, basicamente, com uso de curativos secos. Com o tratamento adequado as úlceras podem cicatrizar em poucos meses, entretanto, úlceras mais extensas e com mais tempo de abertas podem requerer maiores cuidados exigindo terapias auxiliares, tais como, enxerto de pele, uso de botas, aplicação tópica de Burtirato de Arginina ou Sulfato de Zinco (DELANEY et al., 2013).

A utilização da Hidroxiureia é considerada favorável ao quadro geral do paciente falciforme, sem, contudo, colaborar diretamente na prevenção das úlceras ou aceleração de sua cicatrização. Transfusões sanguíneas crônicas são preconizadas para o tratamento, embora não haja dados sistemáticos comprovando sua eficácia (MINITTI et al., 2010).

Observações clínicas e estudos epidemiológicos documentam o papel central do trauma no aparecimento das úlceras. Este fato proporciona uma série de intervenções simples que permitem reduzir a prevalência desta manifestação, como, por exemplo, a

utilização de artefatos portadores para a região comumente afetada (MINITTI et al, 2011).

É importante ressaltar o fato de que as condições sócio econômicas e ambientais tem um importante efeito sobre a frequência e extensão das úlceras, de modo que uma melhor qualidade de vida influenciará as consequências desse fenômeno (SERJEANT, 2005).

2.2.3. Fatores Genéticos

Vários fatores genéticos têm grande importância na modulação do quadro clínico da doença falciforme. Entre os mais conhecidos estão as variações nos níveis da Hb Fetal (HbF), que são inversamente proporcionais à gravidade da doença, o tipo de haplótipo ligado ao *cluster* da globina β , a presença de talassemia α , e de acordo com a literatura, polimorfismos em diversos genes podem estar envolvidos com o surgimento das úlceras de membros inferiores (STEINBERG & ADEWOYE, 2006, HIGGS & WOOD 2008, LETTRE et al., 2008).

2.3. Marcadores Moleculares

2.3.1. Haplótipos β^S

Padrões de sítios polimórficos do DNA ligados ao complexo da β -globina definem os chamados haplótipos da anemia falciforme. A mesma mutação β^S apareceu independentemente em pelo menos cinco diferentes grupos populacionais, e foram denominados de acordo com a região de maior prevalência (SUTTON et al., 1989).

Cinco diferentes haplótipos têm demonstrado serem os mais associados com globina β^S . Os haplótipos são designados de Benin (BEN), Bantu ou República Central

Africana (BAN ou CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-Indiano (ARB) (RUSANOVA et al., 2011).

Os haplótipos do gene β^S estão associados com a evolução clínica na AF e com níveis de HbF, caracterizando assim um prognóstico ao paciente. Portadores de AF e haplótipo Senegal ou Árabe-Indiano apresentam níveis elevados de HbF (>15%), desenvolvendo assim uma forma clínica menos grave da doença; já pacientes que apresentam haplótipo CAR (ou Bantu) desenvolvem um quadro clínico mais grave, por cursarem com níveis diminuídos de HbF (<5%); pacientes que possuem o haplótipo Benin apresentam quadros clínicos intermediários (RAHGOZAR et al., 2000; STEINBERG, 2005; CAJADO et al., 2011).

Polimorfismo na posição -158 no gene γ^G (C→T) em portadores dos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano está fortemente associado com o aumento da expressão da globina γ^G e, conseqüentemente, altos níveis de HbF. Entretanto, mesmo em portadores deste polimorfismo, existe uma diversidade considerável nos níveis de HbF, provavelmente devido a ação de outros elementos regulatórios (STEINBERG, 2005).

A associação do haplótipo da globina β com a severidade clínica da AF deve ser interpretada cautelosamente, pois o valor prognóstico de um haplótipo conhecido em um indivíduo é limitado. Estudos de diferentes grupos étnicos com AF, com características hematológicas distintas, sugerem que o haplótipo da globina β pode ser utilizado com um marcador da doença (STEINBERG, 2005).

2.3.2. Talassemia α

A talassemia α é uma alteração que envolve a diminuição ou ausência de síntese das cadeias α da hemoglobina, podendo ser decorrente de deleções ou

mutações pontuais nos genes α^1 e /ou α^2 . A talassemia α^1 ou α^0 é caracterizada pela perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$) e a talassemia α^2 ou α^+ é representada pela perda de um dos genes α em pelo menos um dos cromossomos ($-\alpha/\alpha\alpha$) (ADAMS et al., 1994; FOGLIETTA et al., 1996). O grau elevado de similaridade presente nos genes α favorece a ocorrência de eventos de recombinação gênica (*crossing-over* desigual) durante a meiose, resultando em deleção do gene α em um cromossomo ($-\alpha$) e triplicação no outro ($\alpha\alpha\alpha$). A talassemia α^2 é a mais freqüente, apresentando dois tipos de deleções, a de 3.7Kb e de 4.2Kb (DODÉ et al., 1993).

A co-herança da AF com a talassemia α tem como consequência a redução do volume corpuscular médio (VCM), menor número de reticulócitos e menor grau de hemólise, conferindo assim uma melhora clínica para os pacientes com úlcera. Os benefícios na evolução clínica que essas alterações podem produzir principalmente a redução na concentração da hemoglobina intracelular, ainda não estão completamente estabelecidos. Aparentemente, úlceras de perna, AVC e anormalidades na retina são menos freqüentes em pacientes com talassemia alfa, embora alguns estudos apontem que estes pacientes poderiam apresentar mais episódios dolorosos devido ao aumento da viscosidade sangüínea correspondente ao aumento da hemoglobina (COSTA, 2004; STEINBERG E ADEWOYE, 2006).

A associação da talassemia α com a AF diminui a hemólise, e protege contra fenótipos associados com os processos hemolíticos, como úlcera maleolar, priapismo e acidente vascular cerebral (KATO et al., 2007). Entretanto, a deleção do gene α parece ser um fator predisponente nas necroses avasculares da anemia falciforme. Por resultar em um aumento nos níveis de hematócrito, promove a elevação da viscosidade sangüínea e compromete a microcirculação dos ossos, especialmente da cabeça do

fêmur e do úmero. Outro motivo é o excesso de cadeias globínicas dentro da hemácia que pode causar dano na membrana do eritrócito e facilitar o comprometimento da microcirculação dos ossos longos, o que corrobora com alguns estudos que apontam que estes pacientes poderiam apresentar mais episódios dolorosos (BALLAS, 2001; BALLAS et al., 1989; STEINBERG, 1986).

Assim, estes achados poderão influenciar nas decisões terapêuticas a serem tomadas, notadamente na prevenção destas úlceras na doença falciforme, que tem uma cicatrização ineficiente, o que levaria a melhoria na qualidade do serviço prestado e qualidade de vida dos pacientes, significando economia de recursos e benefício direto aos pacientes.

2.3.3. eNOS

Em 1987 descobriu-se que o fator de relaxamento vascular derivado do endotélio era, na verdade, efeito do óxido nítrico (ON) sobre o vaso. Atualmente sabe-se que 25% da manutenção do fluxo sanguíneo é assegurado pela ação do ON, e que este fluxo encontrar-se-á diminuído quando a produção de ON estiver inibida (REES et al., 1989; WOOD et al., 2006).

Existem diversos fatores endoteliais que participam junto com o ON na manutenção do tônus vascular, entre eles podemos citar a Endotelina, o Tromboxano A2 e o sistema renina-angiotensina. Entretanto o ON é considerado um regulador chave para o relaxamento vascular *In Vivo* (WOOD et al., 2008).

Sua natureza lipofílica tanto permite ao ON difundir-se rapidamente entre as células endoteliais e a musculatura lisa vascular, como também, ser rapidamente eliminado pela hemoglobina circulante. Deste modo há o correto equilíbrio entre a

sinalização autócrina, sobre o próprio vaso, e a parácrina, sobre os tecidos adjacentes (WOOD et al., 2008).

Um mecanismo importante que pode estar associado com manifestações clínicas da AF é a biodisponibilidade de óxido nítrico (ON), gás sinalizador com tempo de meia vida de segundos, responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo normal. O ON tem papel importante na fisiopatologia da AF e no tratamento das crises vaso-oclusivas (RUBANYI & VANHOUTTE 1986; GLADWIN & SCHECHTER 2001; LOPEZ et al. 2003).

O ON, ao se ligar com a guanilato ciclase, enzima que converte GTP para cGMP, promove o relaxamento do músculo liso vascular, causando uma vasodilatação. Em pacientes portadores de AF, hemoglobina livre proveniente da destruição de hemácias falcizadas consome o ON, produzindo metahemoglobina e nitrato bio-inativo (NOLAN et al. 2006).

Um estado de disponibilidade reduzido de ON na AF prejudica as funções vasculares do óxido nítrico, como inibição da ativação e agregação plaquetária, além da repressão transcricional de moléculas de adesão celular, como VCAM-1 e ICAM-1 (KATO et al. 2008).

A deficiência de ON nos pacientes falciformes pode ser agravada pela destruição da L-arginina, principal substrato da síntese de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), através da liberação de arginases provenientes dos eritrócitos hemolisados (MORRIS et al. 2005).

Espécies reativas de oxigênio, gerados em elevadas taxas em portadores de AF, também consomem óxido nítrico, contribuindo para diminuição da disponibilidade do

ON em pacientes falciformes (ASLAN & FREEMAN, 2004; WOOD et al. 2005; CHIRICO & PIALOUX, 2012).

Com a depleção dos níveis de ON, perde-se o equilíbrio entre a vasoconstrição e vasodilatação, ocorrendo um direcionamento para a vasoconstrição, ativação endotelial e proliferação. Na anemia falciforme, a diminuição dos níveis de ON tem sido associada com hipertensão pulmonar, priapismo, acidente vascular cerebral isquêmico e úlceras de membros inferiores (KATO et al. 2007) (Figura 3).

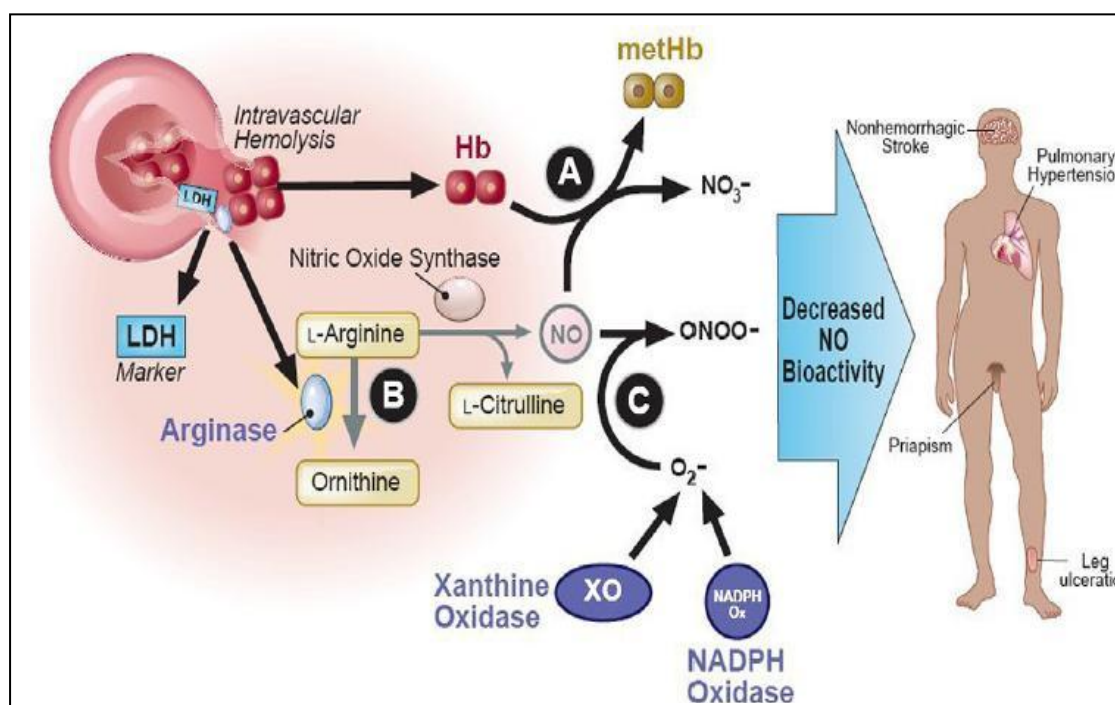


Figura 3: Redução da disponibilidade do ON devido à hemólise intravascular. Hemoglobina plasmática livre consome o ON, produzindo metahemoglobina e nitrato bio-inativo (A). Arginase plasmática consome L-arginase, diminuindo sua disponibilidade para produção de ON (B). Espécies reativas de oxigênio consomem o ON, gerando radicais de oxigênio (C). Na AF, a diminuição da disponibilidade de ON está associada com o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna e AVC isquêmico (Kato et al. 2007).

Terapias direcionadas para o restabelecimento da homeostase do óxido nítrico têm se mostrado promissoras em pacientes com anemia falciforme. Crianças portadoras de AF em crises álgicas agudas, após a inalação de óxido nítrico, apresentaram uma tendência a menores escores de dor, além da diminuição da

necessidade de analgésicos e, conseqüentemente, menor permanência no hospital (WEINER et al. 2003; KATO et al. 2007).

O polimorfismo T-786C do gene *eNOS*, que codifica a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), resulta na redução significativa da atividade da *eNOS*. Estudos têm sugerido que este polimorfismo pode estar associado à predisposição a hipertensão arterial, doenças coronarianas, aneurisma, diabetes, além do desenvolvimento de estenose da artéria carótida interna (NAKAYAMA et al. 1999; GHILARDI et al. 2002). Na anemia falciforme, esse polimorfismo pode modular o desenvolvimento das úlceras de membros inferiores (DRISS et al., 2009; AKHTER et al., 2010; AKINSHEYE & KLINGS, 2010).

2.3.4. *Klotho*

O *Klotho* (KL) é uma proteína transmembrana que é codificada pelo gene *Klotho*, semelhante a β -glucosidase (localização cromossômica: 13p12), que regula muitas funções vasculares, incluindo a expressão do fator de crescimento endotelial vascular. Também parece estar envolvido na supressão de vários fenótipos relacionados ao crescimento humano, dentre eles arteriosclerose, atrofia de pele, osteoporose e infertilidade. Esse gene apresenta uma importante função na regulação da defesa antioxidativa, na atividade da enzima conversora de angiotensina, aterosclerose e envelhecimento. Além disso o KL direta ou indiretamente induz a produção endotelial de NO (BURNETT, 2004; YAMAMOTO et al., 2005).

O endotélio vascular, a partir da liberação de NO em resposta a agonistas específicos, tal como a acetilcolina, apresenta papel importante na manutenção do tônus vascular. Tem-se demonstrado que deficiências no gene *Klotho* atenuam significativamente a vasodilatação endotélio-dependente da aorta e arteríolas em

resposta à acetilcolina (SAITO *et al.*, 1998). Com isto, há evidências de que o Klotho possa regular positivamente a produção de ON, embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos. Acredita-se que a deficiência do gene *Klotho* possa regular negativamente a óxido nítrico sintase (eNOS), decrescendo a síntese de ON, e ainda que deve haver a degradação acelerada do ON por ânions superóxido, já que uma elevação na produção de superóxidos tem sido demonstrada nos processos de envelhecimento. Estes efeitos do Klotho sobre o endotélio vascular protegem, portanto, contra a disfunção endotelial (WANG *et al.*, 2008).

O Klotho também está associado com a regulação de mecanismos de sinalização insulina/ fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), suprimindo o estresse oxidativo. Os fatores de transcrição nucleares conhecidos como *mammalian forkhead box O* (FOXO) são fatores que se ligam diretamente a promotores de enzimas antioxidantes, tais como a catalase e a manganês-superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), induzindo a expressão destas enzimas. Em consequência disso, ocorre o aumento da remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS), conferindo resistência ao estresse oxidativo. Estes FOXOs são regulados negativamente pela sinalização insulina/IGF-1 ativada, a qual promove a fosforilação de uma serina-treonina quinase Akt, ativando-a. A Akt tem a capacidade de fosforilar o FOXO, induzindo, por este mecanismo, a sua exclusão do núcleo e inativação. A proteína Klotho atua inibindo a sinalização insulina/IGF-1, proporcionando um decréscimo na fosforilação dos FOXOs, elevando a expressão de SOD2, minimizando, portanto, o estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2008).

Não está claro como o *Klotho* pode regular a ocorrência de úlceras de membros inferiores, entretanto, polimorfismos no gene *Klotho* pode levar a uma redução na

síntese de ON e a uma menor resistência ao estresse oxidativo, agravando as manifestações vaso-oclusivas e hemolíticas decorrentes da anemia falciforme, entre elas, as úlceras. (NOLAN et al., 2006; FERTRIN et al., 2010).

2.3.5. BMP 6

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), incluindo BMP6 (Proteína morfogenética óssea 6) são membros da família do fator transformador de crescimento β (TGF- β), e foram inicialmente identificadas como indutores potentes de formação óssea ectópica quando implantadas por via subcutânea em cobaias. Estudos demonstraram que BMPs, estão envolvidas com a regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose em diferentes tecidos, dependendo do microambiente celular e interações com outros fatores reguladores. Além do seu papel crítico na manutenção e reparo dos ossos, foi demonstrado a sua função determinante no desenvolvimento embriológico de mamíferos (SYKARAS et al., 2003; BADWIN *et al.* 2005; CAI et al., 2012).

As BMPs exercem os seus sinais através dos receptores transmembrana serina/treonina quinase tipo I e tipo II. Dentro das células, proteínas SMAD possuem um importante papel na transdução do sinal do complexo receptor ativo até o núcleo. A desregulação desta via de sinalização além de ter mostrado envolvimento em doenças esqueléticas, também esteve associada com o câncer e doenças vasculares (CAI et al., 2012).

BMPs iniciam a sinalização na superfície celular ao se ligar no domínio extracelular dos receptores específicos. O receptor do tipo 2 é primeiramente ativado e em seguida ocorre fosforilação do receptor tipo 1. O sinal é propagado para as proteínas SMAD 1 e SMAD 5, que vão ser fosforiladas e posteriormente translocadas para o núcleo, onde irão interagir com proteínas de ligação ao DNA, ou exibir atividade de transcrição direta,

quer como monômeros ou em associação com SMAD 4 (Figura 4). SMADs específicas são expressas em diferentes fases do ciclo celular e exibem funções inibitórias ou estimulatórias (SYKARAS et al., 2003; CAI et al., 2012; HERRERA et al., 2012).

No geral, BMPs regulam a função celular ao nível de transcrição por aumentar a taxa de transcrição e/ou estabilizar o mRNA. O grande número e variabilidade de receptores de BMPs permite que complexos heteroméricos sejam formados com diferentes potenciais de sinalização capaz de induzir varias vias de sinalização quando ligadas no mesmo receptor (SYKARAS et al. 2003).

O gene *BMP6* está localizado no cromossomo 6 (6p24-p23), e codifica a proteína morfogenética óssea 6. Estudos identificaram que polimorfismos nesse gene podem estar associados a várias manifestações clínicas da AF, inclusive às úlceras de membros inferiores, mas o seu papel no desenvolvimento dessas lesões não é bem conhecido (FERTRIN & COSTA, 2010; BADWIN et al. 2005).

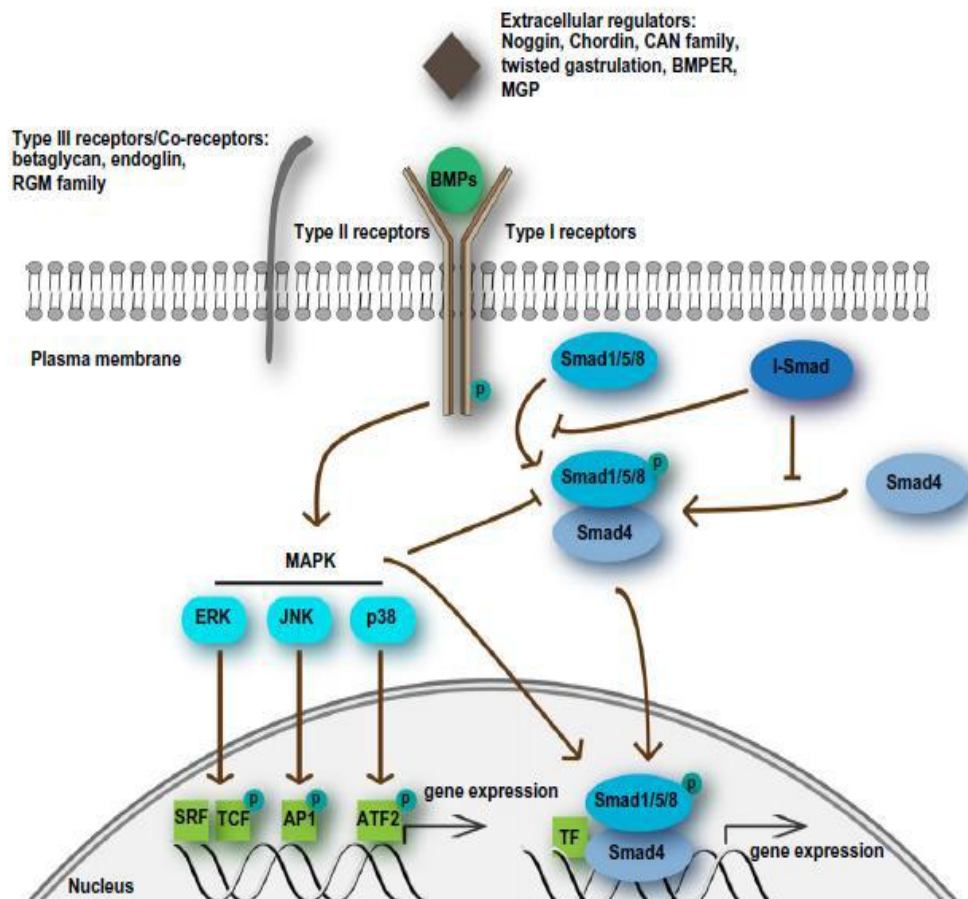


Figura 4. Esquema da via de sinalização SMAD dependente ativada por BMPs (Cai et al. 2012).

2.3.6. TEK

A angiogênese é um processo complexo e dinâmico pelo qual os vasos sanguíneos são formados e remodelados. Várias evidências mostraram que a angiogênese é um evento crucial para o desenvolvimento embrionário normal, e em adultos a angiogênese é necessária para a uma função normal reprodutiva feminina e igualmente necessária na cicatrização de feridas. No entanto, é importante ressaltar que a angiogênese contribui para a patogênese de várias doenças, como o câncer, artrite, obesidade, aterosclerose, diabetes e retinopatias (FOLKMAN,2001). Em contrapartida, algumas doenças, como doenças coronarianas e doenças vasculares periféricas, são causadas por uma falha no processo de angiogênese. O envolvimento, ou a falha da

angiogênese no desenvolvimento dessas doenças levaram às pesquisas para tentar definir mecanismos moleculares que interfiram na formação e remodelamento dos vasos sanguíneos (FOLKMAN,2001;PETERS, 2004).

Um desses mecanismos moleculares envolve a ativação de um gene específico, o TEK. O *TEK* é um gene que está localizado no 9p21 e tem sido associado com malformação venosa e com alguns sub fenótipos da AF, como o acidente vascular cerebral e as úlceras de membros inferiores, apesar de seu papel no desenvolvimento destas manifestações clínicas não ser muito bem conhecido. O TEK é expresso na pele normal, sua expressão aumenta na cicatrização e formação de novos vasos, e diminui quando esses novos vasos estão formados. Como indicação da ativação do TEK, sua fosforilação pode ser detectada em todos os estágios da cicatrização de lesões na pele, como as úlceras de membros inferiores. Sendo assim, polimorfismos neste gene podem prejudicar o processo de cicatrização das úlceras de membros inferiores, em pacientes com AF (PETERS, 2004; NOLAN, 2006).

2.3.7. *TGF-β*

O *TGF-β* (Transforming growth factor- β) é um potente inibidor do crescimento de uma ampla variedade de células, incluindo células epiteliais, células endoteliais vasculares, células hematopoiéticas e linfócitos (ROBERTS & SPORN, 1990; MIYAZONO et al., 1994; BLOBE et al., 2000). Alterações das vias de sinalização de *TGF-β* resultam na perda da regulação do crescimento celular, que é uma das etapas cruciais na oncogênese. *TGF-β* é também um potente indutor de fibrose do tecido, o qual pode fornecer um microambiente adequado para o crescimento de células em transformação (MYIAZONO,2001).

Existem três isoformas do TGF- β , o TGF- β 1, TGF- β 2 e o TGF- β 3 com estruturas e atividades biológicas similares. (ROBERTS & SPORN, 1990). Muitas outras proteínas também têm estruturas essencialmente similares ao TGF- β e são coletivamente incluídas na superfamília TGF- β , que inclui mais de 30 proteínas, entre elas as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (KAWABATA & MIYAZONO, 2000).

Além das funções biológicas já citadas, o TGF- β desempenha algumas atividades de grande importância biológica para um dos sub fenótipos da AF, como as úlceras de membros inferiores. Esta proteína atua como uma citocina pleiotrópica, participando da manutenção da homeostase da epiderme. Além de inibir o crescimento de células epiteliais, o TGF- β coordena a resposta de cicatrização de feridas e regula a reepitelização e inflamação no tecido epitelial (SIEGEL, 2003; O'KANE, 1997).

TGF- β medeia a sinalização através da ligação ao receptor de TGF- β 2 (TGF β RII) seguido por hetero dimerização e fosforilação do receptor de TGF- β 1 (TGF β RI) (SCHILLER,2004; SHI, 2003). TGF β R2 ativado se liga e fosforila Smad 2 ou Smad 3, que se heterodimeriza com Smad 4(INMAN,2002; NICOLAS,2004). Esse complexo é translocado para o núcleo, onde vai agir controlando a expressão de genes alvo (PIEK,1999; MASSAGUE,2000).

Depois de lesão tecidual aguda, a expressão do TGF- β 1 é aumentada, sendo secretada rapidamente por queratinócitos, plaquetas, monócitos, fibroblastos e macrófagos (FALER, 2006). Embora o TGF- β e seus receptores sejam altamente expressos em lesões agudas, a expressão do TGF β RI e TGF β RII é reduzida em lesões crônicas (COWIN, 2001; JUDE,2002).

Alguns estudos têm mostrado que TGF- β aplicado exogenamente acelera a cicatrização de feridas agudas, além de melhorar a cicatrização em modelos animais. No entanto, apesar destes estudos em modelos animais o tratamento de úlceras

crônicas com humanos não atingiu as expectativas (BECK, 1993; SPORN, 1993; SHAH, 1995).

Polimorfismos nos genes TG β RII (3p22) e TGF β RIII (1p33-p32), podem diminuir a expressão destes receptores, prejudicando a ativação de genes alvo, comprometendo a manutenção da homeostase do tecido epitelial, e sendo um provável fator de desenvolvimento de úlceras de membros inferiores (PASTAR, 2010; NOLAN, 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar as bases moleculares e avaliar o impacto clínico de variantes genéticas em pacientes com úlcera de membros inferiores com anemia falciforme acompanhados no serviço de Hematologia da Fundação HEMOPE.

3.2 Objetivos específicos

1. Relacionar os genótipos dos Haplótipos β^S e sua influência na úlcera maleolar;
2. Determinar a frequência da co-herança de $\alpha_2^{3,7Kb}$ talassemia e sua correlação com a úlcera de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme;
3. Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene da *eNOS* (T-786C) e dos polimorfismos rs685417 e rs516306 no gene *Klotho* (*KL*) no desenvolvimento da úlcera de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme;

4. Investigar a associação dos polimorfismos rs603085 e rs671084 no gene *TEK*, no gene *TGF- β* (rs1019856) e (rs2038931) e no gene *BMP6* (rs270393) com o desenvolvimento da úlcera de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme.

4. Material e Métodos

4.1. Casuística

A amostra foi constituída de 100 pacientes casos e 175 pacientes controles. Foi utilizado como critérios de inclusão para os casos: pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS) não relacionados, acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação Hemope (HEMOPE), Recife – PE com histórico atual ou prévio de úlcera de membros inferiores. O grupo de controles será constituído de portadores de anemia falciforme acima de 18 anos que nunca apresentaram úlcera de membros inferiores. Em ambos os grupos serão analisados os perfis clínicos, laboratoriais e moleculares e a convocação dos pacientes será feita por telefone e telegrama.

4.2. Desenho de estudo

O estudo é do tipo corte transversal com comparação de grupos e está sendo realizado nas Unidades de Hematologia Clínica e Laboratórios Especializados da Fundação HEMOPE (UNILABE) e Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da UFPE no período de abril de 2012 a fevereiro de 2014.

4.3. Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) da Fundação Hemope (Nº 035/10) (Anexo). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice).

4.4. Coleta de material

A cada convocação ou durante as visitas de rotina, cerca de 4 ml de sangue periférico será coletada em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante e conduzido para o laboratório de Hemoglobinopatias no setor de unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) e Setor de Hematologia do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a realização dos exames.

4.5. Análise Hematológica e Clínica

As análises dos dados hematológicos foram realizadas utilizando contador eletrônico de células (STKS, Coulter Corporation, FL, USA). A quantificação das hemoglobinas Fetal e S foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA). Os dados clínicos foram obtidos pela análise de prontuários dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE, onde esses dados são atualizados a cada visita de rotina.

4.6. Análise Molecular

4.6.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (DAVIS et al. 1986).

O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, o plasma descartado e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo NH_4Cl 0,144M e NH_4HCO_3 0,01M e após centrifugação o sobrenadante foi desprezado. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 100 μl de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400 μl da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25 μl de SDS 10% e incubado à 55°C durante 30 minutos. Após esse período, 180 μl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com

etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

4.6.2. Reação de Amplificação

A amplificação do material genético foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica, *in vitro*, para amplificação de DNA. A reação, catalisada pela *Taq* polimerase, utiliza *primers* que se hibridizam em fitas opostas de regiões específicas do genoma e flanqueiam a sequência a ser amplificada. Os ciclos são séries repetidas de desnaturação do DNA, anelamento e extensão dos *primers*, resultando em um acúmulo exponencial do fragmento (SAIKI, 1992).

Foram utilizadas técnicas específicas baseadas na PCR, de acordo com os procedimentos diagnósticos.

4.6.3. Pesquisa de Polimorfismos

4.6.3.2. Determinação dos Haplótipos β^S

As análises dos polimorfismos de restrição foram realizadas através da amplificação de cada região do DNA que contém os sítios de interesse pelo método da PCR, seguido de análise de restrição. Para os haplótipos β^S foram analisados 6 sítios polimórficos (5' γ^G -*Xmn* I, γ^G -*Hind* III, γ^A -*Hind* III, $\psi\beta$ -*Hinc* II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc* II, 5' β -*Hinf* I), segundo Sutton e cols. (1989) (Figura 5 e Tabela 1).

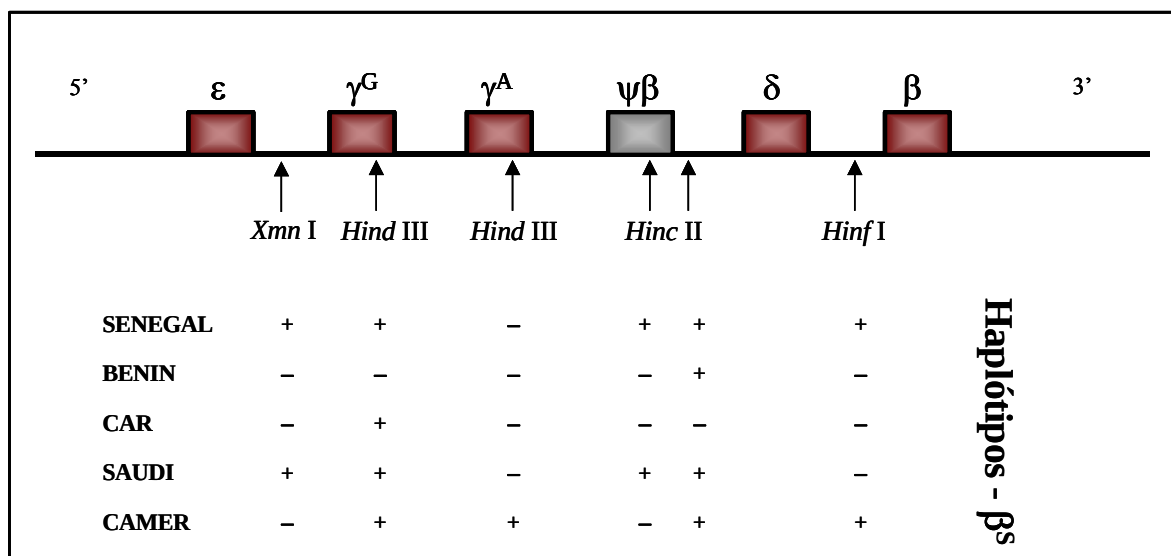


Figura 5: *Cluster* β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^s segundo Sutton e cols. (1989).

Tabela 1: *Primers* utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β: localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

Primer	Seqüência do Primer	Direção	Posição	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	5'γ ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAGAC	←	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	36203	γ ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	γ ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	ψβ
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	49476	3'ψβ
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291	

→: sense; ←: anti-sense.

A composição das reações e condições de amplificação variou dependendo do resultado e estão representadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Componentes	Volumes (μ l)					
	<i>Xmn</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I
	5' γ^G	γ^G	γ^G	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β
Tampão (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTP's (10mM)	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Primer 5' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA Polimerase (5U/ μ l)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	37,75	38,0	38,0	38,0	38,0	38,25
Volume Final (μl)	50	50	50	50	50	50

Tabela 3: Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
			35 ciclos							
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5'	94	45"	60	45"	72	1'30"	72	7'
γ^G	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
$\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	5'	94	45"	57	45"	72	1'30"	72	7'

Para confirmação da amplificação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta, para posterior análise de restrição.

Para a análise de restrição, o produto da PCR é digerido a 37°C durante 24 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. Como controle foi utilizado à amostra de um indivíduo heterozigoto para cada

sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4: Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

<i>Primers</i>	<i>Enzima</i>	<i>Região</i>	<i>Tamanho Fragmento</i>	<i>Fragments Após Clivagem</i>
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5' γ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf I</i>	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina β , é possível definir os haplótipos β^S . Pacientes que apresentarem padrão de restrição diferentes do perfil pré-determinado na literatura tem seu haplótipo considerado “Atípico”.

4.6.3.3. Pesquisa do Genótipo α

A determinação do genótipo α foi realizada pela técnica de PCR, utilizando os *primers* C2 e C10 na pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$ como descrito por Dodé e cols. (1993). A Tabela 5 mostra a sequência dos *primers*.

Na pesquisa da ($-\alpha^{3,7Kb}$), o produto amplificado gera um fragmento de 2,1kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 1,9kb para o haplótipo mutante ($-\alpha^{3,7Kb}$). Foi utilizada a seguinte reação de PCR: 1,0 μ l de DNA (250ng); 2,5 μ l de tampão α^* ; 2,5 μ l de DMSO; 0,75 μ l de dNTP 10mM; 0,5 μ l de cada *primer* 10 μ M; 0,25 μ l de taq polimerase

5U/ μ l, em um volume final de 25,0 μ l de água. Condições de ciclagem: desnaturação inicial 94°C - 10'; 30 ciclos: 94°C - 45"; 56°C - 1' e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 7'.

Tabela 5: Seqüências dos *primers* para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$ e do $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7Kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).

Primers	Seqüência do Primer (5'-3')	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	←	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	→	5641

→: sense; ←: anti-sense.

*Tampão α para PCR - Soluções estoque: 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de $(NH_4)_2SO_4$ 1M; 250 μ l de $MgCl_2$ 1M; 33,5 μ l de Na_2EDTA 0,2M; 85 μ l de BSA-20 mg/ml; 70 μ l de β mercaptoetanol 14,3M, para um volume final de 10 ml com dH_2O . Todas as soluções estoque foram autoclavadas, exceto $MgCl_2$ que é filtrada.

4.6.3.4. Pesquisa do Polimorfismo eNOS T-786C

A pesquisa do polimorfismo T-786C no gene da eNOS foi investigada através de PCR seguidos por digestão do produto de amplificação com a enzima *Msp* I, como decrito por Data e cols. (2003). Os componentes da reação para amplificação da região polimórfica T-786C do gene da eNOS e as condições da reação encontram-se nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6: Composição da reação para amplificação da região polimórfica T-786C do gene da *eNOS*.

Componentes	Volumes (μl)
Tampão (10x)	3,0
MgCl ₂ (50mM)	1,2
dNTP's (10mM)	0,5
<i>Primer Sense</i> (10 μM)	0,5
<i>Primer Antisense</i> (10 μM)	0,5
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/μl)	0,2
DNA (200 ng)	1,0
dH ₂ O	23,1
Volume Final (μl)	30,0

Tabela 7: Condições da reação para amplificação do polimorfismo na região promotora do gene da *eNOS* (T-786C).

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo	T(°C)	Tempo
eNOS -786	96	2'	96	30"	56	30"	72	1'	72	5'

Após confirmação da amplificação, o produto da PCR foi digerido utilizando endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. As enzimas utilizadas e padrões de digestão esperados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: *Primers e Enzima para o estudo do polimorfismo da eNOS (T-786C).*

Gene	Primers	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Produto PCR	Enzima	Produto Digestão
eNOS (T-786C)	S	CTTATCCTCCACTGCTTTTCAGAG	349pb	<i>MspI</i>	352pb + 42pb
	AS	CGCAGGTCAGCAGAGAGACTAG			

Para a análise das endonucleases de restrição, foram utilizados: 8,0 µl do produto amplificado, 1,5 µl do tampão da enzima 10x e 2U da enzima correspondente a cada polimorfismo. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar o volume de 15,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37°C *overnight* (16 horas). O produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1000 a 2,5% (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografado.

A pesquisa do polimorfismo T-786C no gene da eNOS foi investigada através de PCR seguidos por digestão do produto de amplificação com a enzima *Msp I*, como descrito por Data et al. (2003).

4.6.3.5. Pesquisa dos Polimorfismos dos Genes *Klotho*, *TEK*, *TGF-β* e *BMP6*

Para detecção dos polimorfismos do gene *Klotho*, *TEK*, *TGF-β* e *BMP6* foi utilizada a metodologia do PCR em tempo real, através da detecção de mutações (*Single nucleotide polymorphism* - SNP) utilizando o sistema TAQMAN®, que consiste de sondas marcadas com fluorocromos que são desenhadas especificamente para ser complementar a cadeia de oligonucleotídeos. Todas as sondas e *primers* que foram utilizados para pesquisa dos polimorfismos dos genes *Klotho* (*KL*) (rs685417) e (rs516306); no gene *TEK* (rs603085) e (rs671084); no gene *TGF-β* (rs1019856) e (rs2038931) e no gene *BMP6* (rs270393) estão disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site (<https://products.appliedbiosystems.com>). Para realização

desta técnica foi utilizado o PCR em tempo real Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Austrália).

4.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. Após as análises dos dados hematológicos e moleculares, as informações dos grupos caso e controle foram submetidos à análise estatística, realizada pelo teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra

Durante a análise de 500 prontuários, foram encontrados 100 pacientes com úlcera de membros inferiores. O estudo mostrou uma incidência de 20% das úlceras na anemia falciforme em pacientes de Pernambuco. Dos pacientes selecionados, 130 eram do sexo feminino e 145 do sexo masculino. A média da idade dos pacientes incluídos no grupo caso foi de 33,35 anos, sendo 54 do sexo masculino e 46 do sexo feminino. Em nossa população, a idade média ao diagnóstico da úlcera, foi de 24,9 anos.

Em relação ao grupo de pacientes incluídos no grupo controle, 99 são do sexo feminino e 76 do sexo masculino, e a média de idade foi de 30,41 anos.

5.2. Análise Laboratorial

As amostras foram submetidas a: dosagem de Hemoglobina (Hb), Hematócrito (Ht), Hemoglobina S (HbS), Hemoglobina fetal (HbF), Reticulócitos (Ret), Aspartato amino transferase (AST), bilirrubina total (BT), bilirrubina indireta (BI), e lactado

desidrogenase(LDH). Obtivemos resultados estatisticamente significativos, quando comparamos os níveis de HbF e HbS.

Tabela 9: Comparação dos dados hematológicos dos pacientes portadores de AF com e sem úlcera.

Características dos pacientes (Média)	Todos os pacientes (n = 275)	Úlcera + (n = 100)	Úlcera - (n = 175)	p-value
Hb(g/dL),	8,0	7,87	8,06	0,141
Ht (%)	23,99	23,26	24,41	0,284
Ret (%)	9,27	9,4	9,2	0,183
Hb F(%)	7,49	6,19	8,25	0,001
Hb S(%)	89,63	91,00	88,86	0,001
AST	48,95	50,21	48,23	0,463
BT (mg/dL)	3,32	3,62	3,14	0,428
BI (mg/dL)	3,47	3,29	3,58	0,357
LDH(U/L),	1021,36	1096,00	975,33	0,817

5.3. Pesquisa dos Polimorfismos

5.3.1. Haplótipos do gene β^S

Primeiramente foram analisadas as combinações haplotípicas do gene β^S , e não foi encontrado diferença estatisticamente significante (p= 0,60) (Tabela 10).

Tabela 10: Combinações haplotípicas do gene β^S nos grupos casos e controles.

Haplótipos β^S	CASOS	CONTROLES
CAR/CAR	56 (56 %)	100 (58,0%)
CAR/BEN	25 (25%)	49 (26,67%)
CAR/ATP	13 (13%)	19(11,33%)
BEN/BEN	5 (5%)	6 (3,33%)
BEN/ATP	1(1%)	1(0,67%)
Total	100	175

p= 0,60

Por ser o haplótipo relacionado ao pior prognóstico clínico, foi feita uma análise isolando o haplótipo CAR/CAR. Quando comparamos apenas o genótipo CAR/CAR com os demais haplótipos, também, não foi encontrado diferença estatística entre os grupos (p = 0,531) (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação entre o genótipo CAR/CAR e os demais genótipos β^S nos grupos casos e controles.

Alelos β^S	CASOS	CONTROLES
CAR/CAR	45 (45,45%)	87 (49,71%)
NÃO CAR/CAR	54 (54,55%)	88 (50,29%)
Total	99	175

p=0,531

5.3.2. Deleção $\alpha 3.7Kb$

No presente estudo, a co-herança da AF com a deleção do gene α ($\alpha^{3.7Kb}$) não mostrou diferença significativa (p = 0,14) entre os grupos caso e controle (Tabela 3).

Tabela 12: Resultados da pesquisa da deleção alfa talassêmica ($-\alpha^{3,7kb}$) em nossa população de pacientes

Pacientes	Alfa Talassemia ($-\alpha^{3,7kb}$)		TOTAL
	Mutação	Normal	
Casos	23(23%)	77 (77%)	94
Controles	47 (26,85%)	128(73,15%)	175

p=0,375

No grupo controle, 33 pacientes foram heterozigotos e 3 foram homozigotos para a deleção $\alpha^{3,7Kb}$. No grupo caso 17 pacientes se apresentam heterozigotos e 1 paciente foi homozigoto para a deleção $\alpha^{3,7Kb}$.

5.3.3. eNOS

O polimorfismo da eNOS T-786C esteve presente em 41 pacientes com úlcera e em 48 pacientes controles. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os pacientes casos e controles em relação ao polimorfismo eNOS T-786C (p = 0,23) (Tabela 13).

Tabela 13: Pesquisa do Polimorfismo eNOS T-786C nos casos e controles estudados.

Grupos	eNOS T-786C		TOTAL
	TT	TC/CC	
Casos	49 (49,00%)	51 (51,00%)	100
Controles	88 (50,28%)	87 (49,72%)	175

p=0,900

No grupo controle, 67 pacientes foram heterozigotos e 9 foram homozigotos para o polimorfismo T-786C do gene da eNOS. No grupo caso 46 pacientes se

apresentam heterozigotos e 2 pacientes foram homozigotos para o mesmo polimorfismo.

5.3.4. *Klotho*

Em relação aos polimorfismos do gene *Klotho*, não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Tabela 14: Pesquisa do polimorfismo rs685417 do gene *Klotho* nos casos e controles estudados.

Grupos	<i>Klotho</i> rs685417 [A/G]		TOTAL
	AA	AG/GG	
Casos	29 (29,00%)	71 (71,00%)	100
Controles	64 (36,57%)	111 (63,43%)	175

p=0,23

Tabela 15: Pesquisa do polimorfismo rs516306 do gene *Klotho* nos casos e controles estudados.

Grupos	<i>Klotho</i> rs516306 [T/C]		TOTAL
	TT	TC/CC	
Casos	52 (52,00%)	48 (48,00%)	100
Controles	86 (36,57%)	89 (63,43%)	175

p=0,741

5.3.5. *BMP6*

Ao analisarmos os resultados do polimorfismo do gene *BMP6*, não foi encontrado resultado estatisticamente significativo, ao compararmos os grupos caso e controle.

Tabela 16: Pesquisa do polimorfismo rs270393 do gene *BMP6* nos casos e controles estudados.

Grupos	<i>BMP-6 rs270393 [C/G]</i>		TOTAL
	CC	CG/GG	
Casos	39 (39,0%)	61(61,0%)	100
Controles	80 (45,71%)	95 (54,29%)	175

p=0,312

5.3.6. *TEK*

O polimorfismo do gene *TEK* esteve presente em 23 (23,00%) dos pacientes com úlcera, e em 43 (24,58%) dos pacientes controles. Em nossa população estudada, não foi observada diferença estatisticamente significativa, entre os pacientes falciformes dos grupos caso e controle.

Tabela 17: Pesquisa do polimorfismo do gene *TEK* nos casos e controles estudados.

Grupos	<i>TEK rs603085 [A/G]</i>		TOTAL
	AA	AG/GG	
Casos	77 (77,00%)	23 (23,00%)	100
Controles	132 (75,42%)	43 (24,58%)	175

p=0,883

5.3.7. *TGF- β*

Em relação ao gene *TGF- β* , foram analisados dois polimorfismos, o rs1019856 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com úlcera e sem úlceras de membros inferiores.

Tabela 18: Pesquisa do polimorfismo rs1019856 do gene *TGFβR2* nos casos e controles estudados.

Grupos	<i>TGFβR2</i> rs1019856 [C/T]		TOTAL
	CC	CT/TT	
Casos	65 (65,00%)	35 (35,00%)	100
Controles	108 (61,71%)	67 (38,29%)	175

p=0,606

Ao analisar a distribuição genotípica do polimorfismo rs2038931, incluindo na mesma categoria os paciente homozigotos e heterozigotos, também não foi visto diferença entre os dois grupos estudados.

Tabela 19: Pesquisa do polimorfismo rs203831 do gene *TGFβR3* nos casos e controles estudados.

Grupos	<i>TGFβR3</i> rs2038931 [G/A]		TOTAL
	GG	GA/AA	
Casos	64 (64,00%)	36 (36,00%)	100
Controles	129 (73,71%)	46 (26,29%)	175

p=0,101

Ao analisar a distribuição genotípica do polimorfismo rs2038931, analisando os três genótipos isoladamente, foi observada diferença estatisticamente significativa, indicando que o genótipo homozigoto é um fator predisponente para o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores.

Tabela 20: Pesquisa do polimorfismo rs203831 do gene *TGFβR3* nos casos e controles estudados, analisando os três genótipos separadamente.

	<i>TGFβR3</i> rs2038931 [G/A]			TOTAL
	GG	GA	AA	
Casos	64 (64,00%)	31(31%)	5	100
Controles	129 (49,33%)	45 (50,67%)	1	175

p=0,019

6. Discussão

6.1. Análise Laboratorial

De todas as análises laboratoriais realizadas, a HbF e a HbS, apresentaram diferença estatisticamente significativa, entre os grupos caso e controle. No nosso estudo, o grupo controle apresentou maiores níveis de HbF, e o grupo caso apresentou maiores níveis de HbS, assim como descrito em vários trabalhos da literatura. Como se sabe, a HbF está associada com bom prognóstico, protegendo contra as manifestações clínicas da doença, enquanto que maiores níveis de HbS pioram o quadro clínico da AF por aumentar a hemólise e vaso-occlusão. Já com relação aos marcadores hemolíticos, não obtivemos os mesmos resultados de trabalhos anteriores. Pacientes com manifestações clínicas mais relacionadas a um fator hemolítico, como as úlceras de membros inferiores, tendem a apresentar maiores níveis dos marcadores de hemólise, como AST, LDH, BT, BI. Esses pacientes, tendem a apresentar menores níveis de hemoglobina e hematócrito, devido à hemólise. (POWARS, 1991; STEINBERG,2005; NOLAN,2006; DRISS,2009).

6.2. Haplótipos do gene β^S

Powars (1991) concluiu que os haplótipos β^S podem modificar o curso clínico da doença, especialmente no que se refere à vasculopatias, principalmente de rim, pulmão e cérebro. O risco dessas complicações seria de cerca de cinco vezes maior nos indivíduos com pelo menos um cromossomo CAR ou Bantu. Powars (1991) verificou ainda que a presença dessa combinação haplotípica (CAR/CAR) aumenta o risco de eventos vasoclusivos graves em crianças, sendo um provável fator predisponente para úlceras e AVC.

Em trabalho realizado na UNICAMP, com uma amostragem de 85 pacientes, Figueiredo (1996) verificou que o haplótipo CAR foi acompanhado de uma alta prevalência de úlceras de membros inferiores. Entretanto, Rieder (1991) não encontrou uma relação entre os diversos haplótipos do gene β^S e sua relação com diversas manifestações clínicas da AF, entre elas a osteonecrose, síndrome torácica aguda e as úlceras de membros inferiores.

Outras manifestações clínicas da AF também foram relacionadas com os haplótipos β^S , como o estudo realizado por Sarnaik & Ballas (2001) em crianças americanas com AVC sugere que haplótipos CAR e atípicos podem ser mais preditivos de doença grave que outros haplótipos. Sarnaik & Ballas (2001) também inferem que pacientes com a combinação haplotípica CAR/CAR em associação com quatro genes α em homens também parece ser atribuído a um maior risco para AVC que outras combinações. Da mesma forma, Domingos (2014), em trabalho realizado em Pernambuco, indica que a combinação CAR/CAR aumenta os riscos para o desenvolvimento do AVC.

Rusanova e cols. (2011), ao analisar pacientes falciformes provenientes do Panamá, observaram uma alta concentração de HbF em pacientes que apresentavam

o haplótipo SEN/SEN, demonstrando o efeito protetor do haplótipo Senegal em comparação com os outros haplótipos, por aumentar os níveis de HbF e diminuir a lesão tecidual.

Em nosso estudo, a relação entre haplótipos e estado geral da doença, ou sua relação com uma manifestação clínica específica, como as úlceras de membros inferiores, não foi confirmado. É provável que isso tenha acontecido pela alta incidência do alelo CAR, e consequentemente do haplótipo CAR/CAR em nossa população de pacientes falciformes.

6.3. Deleção $\alpha^{3.7Kb}$

Apesar de em nosso estudo, o efeito protetor da deleção $\alpha^{3.7Kb}$ em fenômenos hemolíticos da AF não ser confirmado, seu efeito na incidência de úlceras de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme é controverso; enquanto alguns estudos encontraram uma redução do risco para as úlceras (HIGGS, 1982; PANDEY, 2011) outros estudos não conseguem reproduzir esse fenômeno (STEINBERG, 1984; FIGUEIREDO, 1996).

Em estudo com 44 pacientes portadores de AF da Jamaica, Higgs (1982), verificou que a homozigose para a deleção $\alpha^{3.7Kb}$ é fator protetor para o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores e síndrome torácica aguda.

Pandey e cols. (2011) realizaram um estudo para verificar a influência da talassemia α no fenótipo da AF em um grupo de 60 pacientes indianos. Neste estudo, pacientes com a deleção $\alpha^{3.7Kb}$ apresentaram uma menor incidência de úlceras maleolares, possivelmente por aumentar o hematócrito e por esses pacientes apresentarem um menor VCM, diminuindo a hemólise. Pandey verificou também que a co-herança da AF

com a talassemia α está associada com o aumento da incidência de episódios de dor e osteonecrose, por aumentar viscosidade sanguínea.

Em um estudo multicêntrico com 2147 pacientes vindo de 13 centros clínicos dos EUA, Steinberg e cols, em 1984, não encontraram resultados significativos quando analisou a deleção $\alpha^{3.7Kb}$ e seu papel no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores. Entretanto, ao correlacionar a microcitose com diversas manifestações clínicas da AF, foi visto que o VCM abaixo de 80 fl atuou como fator protetor para o desenvolvimento de úlceras, mas teve uma incidência aumentada de osteonecrose.

Em trabalho realizado em 1996 por Figueiredo e cols. na UNICAMP com uma amostragem de 85 pacientes, não foi confirmado o efeito protetor da deleção $\alpha^{3.7Kb}$ no desenvolvimento de úlceras maleolares.

O efeito da deleção $\alpha^{3.7Kb}$ sobre o fenótipo da AF, também foi muito estudado para o AVC. Enquanto alguns estudos encontraram uma redução do risco para o AVC (Adams et al. 1994; Ohene-Frempong et al. 1998; Sarnaik & Ballas 2001; Hsu et al. 2003; Belisário et al. 2010; Flanagan et al. 2011), outros estudos não verificaram esta associação (Miller et al. 1988; Silva-Filho et al. 2011).

É bem estabelecido que a talassemia α tem um efeito marcante no quadro hematológico do paciente portador de AF. Esses são principalmente devido a diminuição da concentração de HbS refletido no CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), levando a uma diminuição da polimerização da HbS, promovendo um baixo número de células irreversivelmente falcizadas, e conseqüentemente, uma redução da taxa de hemólise. Observa-se também um aumento nos níveis de Hb, Ht e contagem de hemácias, além de uma diminuição do número de reticulócitos (Steinberg 2005).

6.4. eNOS

Vários genes estão relacionados com o sistema endotelial, incluindo o óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enzima que cataliza a formação do óxido nítrico solúvel (ON), proveniente da L-arginina (Vargas et al. 2005). Gladwin & Schechter (2001) sugeriram que uma deficiência na produção de ON possa acontecer nas células endoteliais de pacientes com anemia falciforme.

No presente estudo não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa do polimorfismo T-786C no gene da eNOS, resultado este que difere de alguns trabalhos que encontraram neste polimorfismo um fator de risco para algumas manifestações clínicas da AF. Ao avaliar a combinação haplotípica de polimorfismos no gene da eNOS (T-786C e íntron 4a) no Reino Unido, Hassan e cols. (2003) encontraram resultados significantes com relação a predisposição de doenças cerebrais em pequenos vasos entre pacientes casos e controles portadores de AF.

Ghilardi e cols. (2002), ao comparar populações italianas com e sem desenvolvimento de estenose de artéria carótida, encontraram uma frequência duas vezes maior do polimorfismo T-786C no gene da eNOS nos pacientes que apresentavam o comprometimento vascular em uma população sem AF.

Em 1999, Nakayama verificou que o polimorfismo T-786C no gene da eNOS, diminui a síntese de ON endotelial e atua como fator predisponente para o desenvolvimento de espasmos coronários.

6.5. Klotho, BMP6, TEK e TGF- β

No presente estudo não foi verificada associação com os SNPS dos genes *Klotho*, *BMP6*, *TEK* e o rs1019856 do gene *TGF- β 2*, provavelmente pela amostragem não ser

suficiente, diferentemente de alguns trabalhos publicados. Nolan, em 2006, em um estudo realizado em Boston nos EUA, com 243 pacientes com úlcera e 516 controles, encontrou associação entre os polimorfismos de todos esses genes e úlceras de membros inferiores em pacientes com AF.

Baldwin et al (2005) encontraram associação dos polimorfismos dos genes Klotho e BMP6 com o desenvolvimento da NACF em pacientes com AF nos EUA. Em seu estudo foi utilizada uma amostragem com aproximadamente 800 pacientes, sendo 400 portadores de NACF.

Polimorfismos no gene TEK também foi associado ao AVC em pacientes com AF, sugerindo seu papel em má formação venosa (NOLAN, 2006)

Com relação ao polimorfismo rs2038931 do gene *TGF- β 3*, o presente estudo encontrou associação com o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores, de uma maneira tal, que os pacientes que são homozigotos para o polimorfismo, tem um risco maior de desenvolver essa manifestação clínica na população de pacientes falciformes estudada. Da mesma forma que este estudo, Nolan em 2006, também encontrou os mesmos resultados, sendo o único trabalho da literatura que pesquisou este polimorfismo.

Pastar em 2010, por imunohistoquímica e análise de expressão, verificou que em úlceras que não cicatrizavam, a expressão dos receptores do TGF- β estão diminuídas. É possível que em nossa população, o polimorfismo rs2038931 contribua para a diminuição da expressão do *TGF β 2*, diminuindo assim a ativação de genes alvo, responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido epitelial, aumentando a probabilidade de desenvolver úlceras de membros inferiores.

A diferença na composição genética das populações estudadas e a variação no tamanho da amostragem nos mostra que novos estudos em colaboração serão necessários para determinar as variantes moleculares nos genes *BMP6*, *TEK*, e *Klotho* visto que vários destes SNPs também estiveram relacionados com outras manifestações clínicas presentes na anemia falciforme, como infecção, NACF, AVC e oclusão vascular, sugerindo que as complicações na AF possuam bases moleculares comuns (FERTRIN & COSTA, 2010).

7. Conclusões

- Em nossa população estudada o genótipo da globina- α , o haplótipo β^S e os polimorfismos dos genes *eNOS*, *Klotho*, *BMP6*, *TEK*, *TGF β 2* e *BMP6* não parecem estar relacionados com o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores nos pacientes com AF;
- O polimorfismo do gene *TGF β 3* parece ter alguma influência no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores na população falciforme estudada.

8.Referências Bibliográficas

- Adams RJ, Kutlar A, Mckie V, Carl E, Eichols FT, Liu jc et al. (1994) Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Amerian Journal of Hematology*, 45(4): 279-82.
- Akinsheye I, Klings E (2010) Sickle cell anemia and vascular dysfunction: the nitric oxide connection. *Journal cellular physiology*. 224: 620-625
- Akhter, MS et al. (2010) The nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and their association with deep vein thrombosis in asian indian patients. *Clinica Chimica Acta*.411:649-652.
- Aslan M, Freeman BA. 2004. Oxidant-mediated impairment of nitric oxide signaling in sickle cell disease—mechanisms and consequences. *Cell Mol Biol*, 50: 95–105.
- Baldwin C., nolan VG., Wyszynski DF, Sebastiani P, Embury SH, Bisbee A, Farrell J, Farrer I, Steinberg MH (2005). Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood*. 106(1):372-375.
- Ballas SK, Talacki CA, Rao VM, Steiner RM (1989). The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with α -thalassemia. *Hemoglobin*.; v.13 (7–8), p.649–655.
- Ballas SK & Mohandas N (1996) Pathophysiology of vaso-occlusion. In: Charache S, Jonhson CS. (eds.). *Hematology/Oncology Clinics of North America - Sickle Cell Disease*. V. 10(6), p. 1221-39.
- Ballas SH. 2001. Effect of alpha-globin genotype on the pathophysiology of sickle cell disease. *Pediatric Pathology and Molecular Medicine*; v.20 (2); p.107-21.
- Bandeira FM, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes TM, Marques NM (1999). Hemoglobin “S” positive newborn detected by cord blood and its characteristics. *J Pediatr(RioJ)*,75(3): 167-71
- Beck Is, et al. (1993) One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J. Clin. Invest*. 92:2841–9.
- Belisário AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB (2010) Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin*,34(6):516-29.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor b in human disease. *N Engl J Med*342:1350±1358.
- Bowers AS, Reid HL, Greenidge A, Landis C, Reid M (2013) Blood Viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLOS ONE* 8(7):e68929
- Burnett AL. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J ImpotRes Suppl*. 2004; v.1; p.S15-9.
- Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, Tem Dijke P (2012). *Febs Lett*.586(14):1993-2002.
- Cajado C, Cerqueira BA, Couto FD, Moura-Neto JP, Vilas-Boas W, Dorea MJ et al. (2011). TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308 G>A and -251 A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine*, 56(2): 312-7.
- Cançado RD & Jesus, JA (2007) Sickle cell disease in brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. V.29(3); p.204-206.
- Chang YP, Maier-Redelsperger M, Smith KD, Contu I, Ducroco R, de Montalembert M et al. 1997. The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels; a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br. J. Haematol*, 96: 806-814.
- Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell

disease. IUBMB Life.(2012) 64(1):72–80.

Chiang EY & Frenette, PS (2005) Sickle cell vaso-occlusion. *Hematology Oncology Clinics of North America*, v.19, n.5, p.771-84.

Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF (2009). Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*; v.33; n.1; p.1-16.

Cowin AJ, *et al.* (2001) Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J. Invest. Dermatol.* 117:1282–9.

Data SA, Roltsch MH, Hand B, Ferrel RE, Park JJ, Brown MD (2003). eNOS T-786C genotype, physical activity, and peak forearm blood flow in females. *Med Sci Sports Exerc*, 35(12): 1991-7.

Davis LG *et al.* (1986) Basic method in molecular biology. Londres: Elsevier. 388p.

De Franceschi L, Cappellini MD, Olivieri O (2011). Thrombosis and sickle cell disease. *SeminThromb Hemost*, 37(3):226-36.

De Franceschi L, Corrocher R (2004) Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica*, v.89, n.3, p.348-56.

Delaney KM, Axelrod KC, Buscetta A, Hassell KL, Adams-Graves PE *et al.* (2013) Leg ulcers in sickle cell disease: current patterns and practices. *Hemoglobin* 37: 325-332.10.3109/03630269.2013.789968PubMed: 23600469.

Driss A *et al.* (2009) Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics insights*. 30(2): 23–48.

Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochete J (1993). Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$ by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol*, 83(1): 105-11.

Faler BJ, *et al.* (2006) Transforming growth factor beta and wound healing. *Perspect.Vasc.Surg.Endovasc.Ther.*18:55–62.

Fertrin KY & Costa FF (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert reviews of hematology*; v.3(4); p.443-458.

Figueiredo MS, Kerbaui J, Goncalves MS, Arruda VR, Saad ST, Sonati MF *et al.* (1996) Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *American Journal of Hematology*;53(2):72-6.

Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R *et al.* (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood*, 117(24):6681-4.

Foglieta E, Deidda G, Graziane B, Modiano G, Bianco I. 1996. Detection of α -globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica*; v.84; p.387-396.

Folkman J (2001) Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol* 28:536–542

Gayen Betal S, Setty BN (2008). Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin-binding domain. *Transl Res*, 152(4):165-77.

Ghilardi G, Biondi ML, Demonti M, Bernini M, Turri O, Massaro F *et al.* (2002) Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Chem*, 48(7): 989-93.

Gladwin MT, Schechter AN (2001). Nitric oxide therapy in sickle cell disease. *Semin Hematol*,38(4):333-42.

Hassan A, Gormley K, O'sullivan M, Knight J, Sham P, Vallance P *et al.* (2004). Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke* 35(3):654-9.

Herrera B, Sanchez A, Fabregat I, (2012). BMPS and liver: more questions than

answers.CurrPharmDes.18(27):4114-4125.

Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, Mason W, Serjeant BE, Serjeant GR (1982) The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *New England Journal of Medicine* 306:1441-1446

Higgs DR & Wood WG (2008) Genetic complexity in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* . V.105(33),p.11595-11596.

Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, Mckie V, Wang W et al. (2003) Alpha thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *Journal of Pediatrics Hematology Oncology*,25:622-8

Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. (2002) Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol. Cell.* 10:283–94.

Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW. (2002) Transforming growth factorbeta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet.Med.*19:440–7.

Kato GJ et al. (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood reviews.* 21: 37-47.

Kawabata M, Miyazono K. 2000. Bone morphogenetic proteins. In: Canalis E, editor. *Skeletal Growth Factors*. Philadelphia: LippincottWilliams & Wilkins. p 269±290.

Lettre G et al. (2008) Dna polymorphisms at the bcl11a, hbs1l-myb, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.105(33),p.11869-74.

Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JA, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad ST et al. 2005. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica*, 21(4): 1287-90.

Lopez BL, Kreshak AA, Morris CR, Davis-Moon L, Ballas SK, MA XL. 2003. L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department.*BrJ Haematol*, 120(3):532-4.

Massague J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169–78.

Miller ST, Rieder RF, Rao SP, Brown AK (1988) Cerebrovascular accidents in children with sickle-cell disease and alpha-thalassemia. *The Journal of Pediatrics*, 113:847-849

Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MF, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *AmJHematol.* 2010;85(10):831–833.

Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V et al. 2005. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. *Jama*, 294: 81–90.

Miyazono K, Ten Dijke P, Ichijo H, Heldin C-H (1994). Receptors for transforming growth factor-b. *Adv Immunol* 55:181±220.

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling.*JCellPhysiol.* 2001;187:265–276.

Nagel RL & Steinberg MH (2001) Genetics of the β^s gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and management*. Cambridge university press: ny, usa, cap. 26, p. 711-755.

Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H et al. (1999) T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 99(22): 2864-70.

Nicolas FJ, de Bosscher K, Schmieder b, Hill CS. (2004) Analysis

of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *J. Cell Sci.* 117:4113–25.

Nolan VG *et al.* (2004) Association of single nucleotide polymorphisms in *klotho* with priapism in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*; 128(2):266-72.

Nolan VG *et al.* (2006) Sickle cell ulcers: association with haemolysis and snps in *klotho*, *tek* and genes of the *tgf- β / bmp* pathway. *British Journal of Haematology*; 133(5):570-578.

Nolan , wyszynski df, farrer la, steinberg mh. 2005. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, 106(9): 3264-7.

Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW *et al.* (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*, 91:288–294

O'kane S, Ferguson MW (1997) Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29:63–78.

Paladino SF (2007) Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 29(3): 288-290.

Pagnier J *et al.* (1984) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; v. 81; p. 1771-1773.

Pandey S, Pandey S, Mishra RM, Sharma M Saxena R (2011) Genotypic influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. *Korean Journal of Hematology* Sep; 46(3):192-195.

Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, *et al.* (2010) Attenuation of TGF β Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers. *Mol Med* 16:92–101.

Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, Dewhirst MW, Sankar S. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res.* 2004

Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J.* 13:2105–24.

Powars DR (1991) β^s gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. *Hematol. Hematology/Oncology Clinics of North America*; v. 5; p. 475-493.

Rahgozar S *et al.* (2000) β^s gene in central iran is in linkage disequilibrium with the indian-arab haplotype. *American Journal of Hematology*, v. 65, p.192-1

Rees DC, Lambert C, Cooper E, Bartram J, Goss D, Deane C *et al.* 2009. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood*, 114:742-743.

Rieder R.F *et al.* (1991) Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, v. 36, p. 184-9.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 250: 822-7.

Rusanova I, Cossio G, Moreno B, Javier Perea F, de Borace RG, Perea M *et al* (2011) β -globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. *American Journal of Human Biology*, 23(3):377-80.

Saiki RK. The design and optimization of the PCR. In: Erlich, HA. *PCR technology - Principles and applications for DNA amplification*. 1^a ed. New York: Oxford University: TyPress, 1992; 7-16p.

Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama, Y, Aizawa H, Suga T, Matsumura Y, Masuda H, Kurabayashi M, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R. *Klotho* protein protects against endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 248:324–329.

Sarnaik SA, Ballas SK (2001) Molecular characteristics of pediatric patients with sickle

cell anemia and stroke. *American Journal of Hematology*, 67(3): 179-82

Serjeant GR *et al.* (2005) Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Oncology Clinics of North America*. 19: 943-956.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. (1995) Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J.CellSci.* 108:985–1002.

Silva-Filho IL, Leite AC, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, Azevedo FC *et al* (2011). Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, 69(3): 431-5.

Sporn MB, Roberts AB. (1993) A major advance in the use of growth factors to enhance wound healing. *J. Clin. Invest.* 92:2565–6.

Siegel PM, Massague J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 3:807–21.

Steinberg MH *et al.* (1984) Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. *Blood*, v. 63, p. 1353-60.

Steinberg MH (2009) Management of sickle cell disease; *New England Journal of Medicine* v.340, p.1021-1030.

Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, 129(4): 465-81.

Steinberg MH (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The scientific world journal*. Special issue: hemoglobinopathies. Review. 8: 1295-1324.

Steinberg MH, Embury SH. 1986. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*; v.68 (5); p.985-90.

Steinberg MH & Adewoye AH (2006) Modifier genes and sickle cell anemia. *Curr opin hematology*. V.13(3), p.131-136.

Solovey A *et al.* (1997) Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N engl j med*, v. 337, n.22, p. 1584-1590.

Sutton M *et al.* (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*; v. 32,p.66-69.

Sykaras N., Opperman I.a.2003.Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what they offer the clinician? *J Oral Sci.* 45(2):57-73.

Weiner DL, Hibberd PL, Betit P, Cooper AB, Botelho CA, Brugnara C. 2003. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA*, 289:1136–42.

Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. 2005. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J*, 19: 989–91.

Wood KC, Hebbel RP, Lefer DJ, Granger DN. Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(8):1443–53.

Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(8):1506–28.

Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:38029–38034.

Zhou Z, Behrmer M, Guchhait P. 2011. Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. *Anemia*, 20

Apêndice

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Investigação de Polimorfismos em Genes que Podem Estar Relacionados ao Desenvolvimento Úlcera de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme

Pesquisadores: Diego Arruda Falcão (Graduado em Biomedicina), Betânia Lucena Tavares Borges Domingues (Mestre), Marcos André Cavalcanti Bezerra (PhD), Dr. Aderson da Silva Araújo (PhD). **Local:** Fundação Hemope / UFPE

A finalidade deste é trazer informações para o paciente sobre o estudo “Investigação das Características Moleculares Associadas à Úlcera de Membros Inferiores em Pacientes com 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 de 4,5 ml, 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.

Investigação de Polimorfismos em Genes que Podem Estar Relacionados ao Desenvolvimento Úlcera de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme

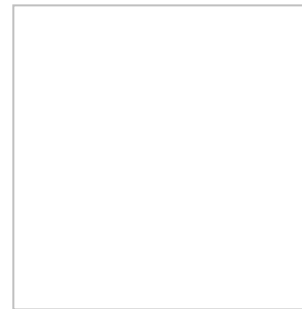
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(maiores de 18 anos)

_____, neste ato representado por mim, _____, está sendo convidado a participar do estudo “Investigação das Características Moleculares Associadas à Úlcera de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme” e recebeu todas as informações necessárias relativas à pesquisa. Autorizo a coleta de 1 amostra de sangue periférico de 4,5 ml que serão utilizadas nesse estudo. Outros pontos importantes foram enfatizados:

- 1- Ampla liberdade de recusar em participar do estudo ou retirar o consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo da continuidade do tratamento.
- 2- Garantia de sigilo que assegure a 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 na sua participação e autorizo a equipe responsável a manipular os dados e armazenar o material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.



Assinatura do paciente ou responsável legal

Data

Autorização para armazenamento de material biológico

Data

Pesquisador responsável

Anexo 1

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com	 Governo do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	---	---

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL : Nº. 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:

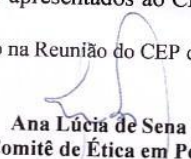
Objetivo Geral: Determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade clínica da anemia falciforme.
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de $\alpha_2^{3,7kb}$ talassemia e da triplicação do α ($\alpha\alpha\alpha$) influenciando nas manifestações clínicas do acidente vascular 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 dos SNPs rs2228088 (T- >G), localizado na região codificadora do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação dos 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 nº. 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 2: Artigo Não Relacionado à Dissertação

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

10.1007/s00277-014-2016-1

Original Article

Influence of the β^S haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia

Igor F. Domingos^{1,2}, Diego A. Falcão¹, Betania L. Hatzlhofer¹,
², Anderson F. Cunha³, Magnun N. Santos⁴, Dulcinéia M. Albuquerque⁵, Kleber Y. Fertrin⁵, Fernando F. Costa⁵, Renata C. Azevedo², Cintia G. Machado², Aderson S. Araújo², Antonio R. Lucena-Araujo¹ and Marcos A. Bezerra^{1,2}

(1)Department of Genetics, Centre of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE, 50670-901, Brazil

(2)Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil

(3)Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil

(4)Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

(5)Haematology and Haemotherapy Centre, University of Campinas, São Paulo, Brazil

Antonio R. Lucena-Araujo

Email: araujoarl@hotmail.com

Received: 30 October 2013 **Accepted:** 9 January 2014 **Published online:** 4 February 2014

Abstract

Stroke is a catastrophic complication of sickle cell anaemia (SCA) and is one of the leading causes of death in both adults and children with SCA. Evidence suggests that some genetic polymorphisms could be related to stroke development, but their association remains controversial. Here, we performed genotyping of five published single nucleotide polymorphisms, the α -thalassemia genotype, the *G6PD* A (–) variant deficiency, and the β^S haplotype in a large series of SCA patients with well-defined stroke phenotypes. Of 261 unrelated SCA patients included in the study, 67 (9.5 %) presented a documented, primary stroke event. Markers of haemolysis (red blood cell (RBC) counts, $p = 0.023$; reticulocyte counts, $p = 0.003$; haemoglobin (Hb) levels, $p < 0.001$; indirect bilirubin levels, $p = 0.006$; lactate dehydrogenase (LDH) levels, $p = 0.001$) were associated with stroke susceptibility. Genetically, only the β^S haplotype (odds ratio (OR) 2.9, 95 % confidence interval (CI) 1.56 to 4.31; $p = 0.003$) and the $\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia genotype (OR 0.31, 95 % CI 0.11 to 0.83; $p = 0.02$) were associated with increased and decreased stroke risk, respectively. In multivariate analysis, the β^S haplotype was independently associated with stroke development (OR 2.26, 95 % CI 1.16 to 4.4; $p = 0.016$). Our findings suggest that only the β^S haplotypes and the $\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia genotype modulate the prevalence of stroke in our SCA population. Genetic heterogeneity among different populations may account for the irreproducibility amongst different studies.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:[10.1007/s00277-014-2016-1](https://doi.org/10.1007/s00277-014-2016-1)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords

Sickle cell anaemia Stroke Genetic polymorphisms α -Thalassemia β^S haplotype

Introduction

Sickle cell anaemia (SCA) is an inherited monogenic disease characterized by a heterogeneous clinical course, which is influenced not only by genetic features, but also by environmental, social, and economic factors [1–3]. Clinical events of SCA occur in response to intravascular sickling, haemolysis, and leucocytosis [4–6], as well as the association between red sickled cells and other blood components [7–9]. Together, these factors lead to vascular occlusions and related events, which ultimately reflect in pain, leg ulcers, priapism, acute chest syndrome, osteonecrosis, and stroke [2].

According to several studies [4, 5, 10–12], stroke is the most catastrophic complication in SCA, representing 20 % of mortalities in both adults and children and making SCA the most common cause of childhood stroke [13, 14]. Currently, transcranial Doppler (TCD) ultrasonography, a noninvasive method of measuring flow velocities in intracranial arteries, is considered the most clinically useful prognostic tool available for primary stroke prevention in SCA patients [15]. Nevertheless, TCD is restricted to children, and it does not accurately identify all SCA patients who will develop cerebrovascular complications. Thus, there is an increasing need of more sensitive and specific markers, which can better determine the risk of stroke in SCA patients.

Several studies have identified an association between putative gene polymorphisms and the development of cerebrovascular disease in SCA patients [16–19]. In fact, evidence from sibling-pair analyses has shown a genetic contribution to stroke development and higher TCD velocities in SCA [20, 21]. These findings, along with the limitations of TCD, highlight the importance of further investigation into the potential association of genetic regions, which could help to define mutations with stroke risk or protection in SCA. In the present study, we genotyped five published single nucleotide polymorphisms (SNPs) (*TNF- α G308A*, *eNOS T786C*, *MTHFR C677T*, *PT G20210A*, and *FV Leiden G1691A*) and the *G6PD A⁻* variant mutation, as well as classic genetic markers in SCA (α -thalassemia genotype and β^S -globin gene haplotype), and evaluated their relationship with the clinical and haematological features and their possible prognostic impact on the development of stroke in SCA patients.

Material and methods

Patients

The present study was drawn from a cohort of 261 unrelated patients with SCA (SS homozygotes), who had been attending at the Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Brazil, since January 2000. Between August 2010 and November 2011, peripheral blood (PB) samples were collected, and genomic DNA was extracted using the Puregene kit (Gentra System, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's protocol. SCA was diagnosed for each patient on the basis of haemoglobin (Hb) electrophoresis. Additionally, clinical data and imaging exams (TCD, X-ray, CT, and/or magnetic resonance imaging (MRI)) were obtained from the patients' medical records. Therefore, imaging exams, clinical histories, and adequate DNA sample availability constituted the inclusion criteria of this study. Documented primary stroke events ($n = 67$) in patients were confirmed with an imaging exam (MRI or CT), clinically evaluated by a neurologist. As a control, a nonstroke group was selected from SCA patients who had not received prior hydroxyurea treatment ($n = 140$); none of these participants had a history of clinical stroke, elevated TCD velocities, or any evidence of silent infarcts, based on their baseline brain MRI. Finally, paediatric SCA patients ($n = 54$) with abnormally high flow velocities (TCD velocities ≥ 170 cm/s), and without any evidence of stroke, constituted a third group of patients. In accordance with

the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients and/or parents. This study was approved by the local Research Ethics Board (#014/2010).

Laboratory data

Full blood counts were done on a Coulter STKS (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Classical parameters were measured, such as red blood cell (RBC) counts, Hb, and reticulocyte counts. The quantification of haemoglobin F (HbF) was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the Bio-Rad Variant II HPLC system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Routine biochemical parameters were measured using a Roche Cobas Mira Plus Chemistry Analyzer (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).

SNP genotyping

After genomic DNA extraction, five SNPs, which had previously been determined to be associated with stroke events (*TNF- α G308A*, *eNOS T786C*, *MTHFR C677T*, *PT G20210A*, and *FV Leiden G1691A*) were genotyped, along with α -thalassemia status, the *G6PD A⁻* variant deficiency [22], and the β^S -globin gene haplotype of each patient. Classic β^S -globin gene haplotypes were determined using six SNPs within the β -globin locus [23], resulting in alleles, which primarily represent the five classic S haemoglobin (HbS) gene haplotypes, including Benin, Central African Republic, Senegal, Arab-Indian, and Cameroon. The α -thalassemia status of each patient was also determined, as previously described [24]. All other molecular analyses were determined by restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction, as previously described [14, 25–28].

Statistical analyses

Patient baseline characteristics were descriptively reported. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) and STATA Statistical Software 9.0 (STATA, College Station, TX, USA), with the level of significance set to 5 %. Patients presenting with a documented, primary stroke event on clinical records were called “stroke positive”; patients presenting with a risk of developing a stroke, but without evidence of a stroke event, were called “stroke risk”; patients without records of stroke were defined as “stroke negative”. Clinical and laboratory features were then compared. Fisher’s exact test was employed to compare associations between categorical variables, and two-way ANOVA, followed by Dunn’s posttest, was applied to compare continuous variables. Univariate and multivariate proportional hazards (PH) regression analyses were performed for potential prognostic factors for stroke. Potential prognostic variables considered for model inclusion were quantification of HbF, β^S -globin haplotype, and $\alpha^{3.7\text{kb}}$ -thalassemia deletion.

Results

Approximately 1,500 sickle cell disease patients are registered and monitored at the haematology clinic of HEMOPE. Of these, 1,200 patients were diagnosed with SCA, carrying the HbSS genotype, as previously characterized [29, 30]. After a careful analysis of approximately 700 medical files and according to inclusion criteria (availability of imaging exams, clinical histories, and adequate DNA samples), 261 patients were selected. Of these, a total of 67 (9.5 %) patients presented a documented, primary stroke event, which was confirmed with an imaging exam. The majority of patients ($n = 62$, 92 %) presented ischaemic stroke, while only three and two patients presented silent infarcts and haemorrhagic stroke, respectively. Due to a small number of patients in these latter groups, the univariate analysis taking into account stroke aetiology could not be performed. All patients, allocated to either the control or stroke-risk groups, remained free of clinical stroke during the entire study.

Initially, we compared the clinical and laboratory features of the SCA patients according to stroke status. Stroke susceptibility (i.e. patients with documented, primary stroke events or patients with risk of developing stroke, based on abnormally high flow velocities on the TCD) was greater for females ($p = 0.015$). Markers of haemolysis, such as RBC counts ($p = 0.023$), reticulocyte counts ($p = 0.003$), levels of Hb ($p < 0.001$), indirect bilirubin ($p = 0.006$), and lactate dehydrogenase (LDH) ($p = 0.001$), were significantly associated with stroke susceptibility. In agreement with these results, the quantification of HbF ($p < 0.001$) was different among the three groups (Table 1).

Table 1

Clinical, molecular, and laboratory features of SCA patients, according to cerebral vascular disease status, stroke development, and stroke risk

Table 1 Clinical, molecular, and laboratory features of SCA patients, according to cerebral vascular disease status, stroke development, and stroke risk

Characteristics of patients	All patients (n=261)		Stroke positive (n=67)		Stroke risk (n=54)		Stroke negative (n=140)		p value
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Gender									0.015 ^a
Male	122	46.7	24	35.8	21	38.9	77	55	
Female	139	53.3	43	64.2	33	61.1	63	45	
RBC (×10 ⁶ /mm ³), median	2.5		2.5		2.4		2.6		0.023 ^a
Range	1.6–3.8		1.7–3.6		2–3.3		1.6–3.4		
Hb (g/dL), median	7.7		7.5		7.3		8		<0.001 ^a
Range	5.6–10.7		5.7–9.5		5.6–8.8		5.9–10.7		
HbF (%), median	7.2		5.3		11.1		6.8		<0.001 ^a
Range	0.9–27.8		1.0–27.8		0.9–27.1		0.9–26		
Reticulocyte (×10 ⁶ /mm ³), median	0.22		0.23		0.24		0.22		0.003 ^a
Range	2.4–22.7		2.4–22.7		4.8–19.9		2.6–21		
I-Bil (mg/dL), median	3.0		2.5		2.7		3.3		0.006 ^a
Range	0.15–16		0.21–7		0.17–6.22		0.15–16		
LDH (U/L), median	1139.7		1335.5		1,193		1,036		0.001 ^a
Range	251–3,692		251–3,692		668–1,863		283–2,652		
Hb ^S haplotype									0.001 ^a
CAR/CAR	147	56.3	48	71.6	35	64.8	64	45.7	
non-CAR/CAR	114	43.7	19	28.4	19	35.2	76	54.3	
α ^{3.7kb} status									<0.001 ^a
α ^{3.7kb} negative	215	82.4	62	92.5	50	92.6	103	73.6	
α ^{3.7kb} positive	46	17.6	5	7.5	4	7.4	37	26.4	
αα ^{anti-3.7kb}									0.146
ααα ^{anti-3.7kb} negative	260	99.6	67	100	53	98.1	140	100	
ααα ^{anti-3.7kb} positive	1	0.4	–	–	1	1.9	–	–	
PT status									0.451
PT G20210A ^{negative}	257	98.5	65	97	53	98.1	139	99.3	
PT G20210A ^{positive}	4	1.5	2	3	1	1.9	1	0.7	
FV Leiden status									0.409
FV G1691A ^{negative}	257	98.5	65	97	54	100	138	98.6	
FV G1691A ^{positive}	4	1.5	2	3	–	–	2	1.4	
MTHFR C677T									0.88
MTHFR ^{CC}	138	52.9	34	50.7	28	51.9	76	54.3	
Homozygosis ^{CT + TT}	123	47.1	33	49.3	26	48.1	64	45.7	
MTHFR C677T									0.252
MTHFR ^{CC}	138	89.6	34	82.9	28	93.3	76	91.6	
MTHFR ^{TT}	16	10.4	7	17.1	2	6.7	7	8.4	
eNOS T786C									0.915
eNOS ^{TT}	122	46.7	30	44.8	25	46.3	67	47.9	
eNOS ^{TC + CC}	139	53.3	37	55.2	29	53.7	73	52.1	
eNOS T786C									0.104
eNOS ^{TT}	122	88.4	30	95.5	25	78.1	67	90.5	
eNOS ^{CC}	16	11.6	3	4.5	7	21.9	7	9.5	
G6PD A- (G202A)									0.376
Normal	242	92.7	64	95.5	48	88.9	130	92.9	
Mutated	19	7.3	3	4.5	6	11.1	10	7.1	
TNF-α (G308A)									0.24
Normal	211	80.8	53	79.1	48	88.9	110	78.6	

Table 1 (continued)

Characteristics of patients	All patients (n=261)		Stroke positive (n=67)		Stroke risk (n=54)		Stroke negative (n=140)		p value
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
Mutated	50	19.2	14	20.9	6	11.1	30	21.4	

RBC red blood cell, *Hb* haemoglobin, *HbS* S haemoglobin, *HbF* fetal haemoglobin, *LDH* lactate dehydrogenase, *PT* prothrombin, *FV Leiden* factor V Leiden, *MTHFR* methylenetetrahydrofolate reductase, *eNOS* endothelial nitric oxide synthase, *TNF-α* tumour necrosis factor α, *CAR* Central African Republic (Bantu)

^a Indicates statistically significant differences

RBC red blood cell, *Hb* haemoglobin, *HbS* S haemoglobin, *HbF* fetal haemoglobin, *LDH* lactate dehydrogenase, *PT* prothrombin, *FV Leiden* factor V Leiden, *MTHFR* methylenetetrahydrofolate reductase, *eNOS* endothelial nitric oxide synthase, *TNF-α* tumour necrosis factor α, *CAR* Central African Republic (Bantu)

^aIndicates statistically significant differences

Genotyping results showed that the classic Central African Republic (CAR) β^S -globin haplotype (CAR/CAR) was detected in 147 patients (56 %). Patients with the homozygous CAR/CAR haplotype had an almost threefold higher risk of developing stroke, as compared with the non-CAR/CAR group (odds ratio (OR) 2.9, 95 % confidence interval (CI) 1.56 to 4.31; $p = 0.003$). The presence of the $\alpha^{3.7kb}$ -thalassemia deletion was also associated with an increased stroke risk (OR 0.31, 95 % CI 0.11 to 0.83; $p = 0.02$). In multivariate analysis, the quantification of HbF (OR 0.88, 95 % CI 0.82 to 0.96; $p = 0.003$) and the β^S -globin haplotype (OR 2.26, 95 % CI 1.16 to 4.4; $p = 0.016$), but not the $\alpha^{3.7kb}$ -thalassemia deletion (OR 0.37, 95 % CI 0.13 to 1.04; $p = 0.06$), were independently associated with higher stroke. In contrast, the *G6PD A⁻* variant (OR 0.54, 95 % CI 0.15 to 1.93; $p = 0.347$) was not associated with stroke risk. Additionally, the investigation of the five candidate SNPs, which had previously been shown to be associated with stroke risk (*TNF-α G308A*, *eNOS T786C*, *MTHFR C677T*, *PT G20210A*, and *FV Leiden G1691A*), failed to reveal a difference among the three groups. All of the main clinical and laboratory features are summarized in Table 1.

The mean age to develop stroke was 12.4 years (range, 1 to 44 years). Since the pathology and severity of strokes vary with age, we decide to evaluate separately patients who experienced stroke in different age groups, in addition to the stroke-risk and stroke-negative groups. Based on the mean age, patients who experienced stroke were grouped in over and under 12 years. β^S haplotype ($p = 0.001$) and the $\alpha^{3.7kb}$ -thalassemia genotype ($p = 0.0001$) retained their association with increased and decreased stroke risk, respectively. Intriguingly, the *eNOS T786C* polymorphism was more frequent in stroke-positive patients aged over 12 years (11 %) compared with that of patients aged less than 12 years (2 %) ($p = 0.046$).

Upon the observation of the striking similarities between the stroke-positive and stroke-risk groups in their clinical and laboratory features, these two groups were pooled together. Their combined results were also compared with those of the control group. Except for the quantification of HbF ($p = 0.23$), which were no longer significantly different, all other results remained similar after pooling (supplementary Table 1).

Discussion

Estimates suggest that 3 to 6 % of the Brazilian population carry the HbS gene, and 700 to 1,000 new cases of sickle cell disease are diagnosed each year [29–31], making SCA a public health issue. The most catastrophic complication of SCA is stroke, representing one of the main causes of death in both adults [5] and children with SCA [4, 12]. Nevertheless, despite the higher incidence, causes of increased risk of stroke in SCA patients are not completely understood.

Several lines of evidence suggest that a genetic signature could influence stroke development in SCA [16–18, 20, 21], and the combined effect from these genes could affect the severity of SCA [16, 32, 33]. In fact, Flanagan et al. [19] demonstrated a significant association between previously reported polymorphisms and stroke.

The authors admitted, however, that these results remain controversial primarily due to the relatively small sample size and the absence of validation studies using additional cohorts of patients. Here, despite using a large series of Brazilian SCA patients, we were unable to demonstrate a direct association between the five genetic polymorphisms and stroke development. However, it must be highlighted that our cohort (261 unrelated SCA patients) presents its own characteristics and particular distribution of molecular markers, particularly regarding the β^S -globin gene cluster haplotypes. Bezerra et al. [30] genetically characterized a cohort of 74 paediatric SCA patients in the state of Pernambuco, Brazil, and showed that approximately 65 % of SCA patients presented the CAR/CAR haplotype, a frequency significantly higher compared to those of other states in the northeast region of Brazil. These findings suggest a possible genetic heterogeneity among different populations, which might account for the conflicting results between genetic association studies.

In accordance with previous studies [4, 32, 34–36], our results showed a preventive effect of α -thalassemia on the development of stroke in SCA. In support, Hsu et al. [36] showed that the frequency of α -thalassemia was significantly higher in SCA patients with no changes in TCD, suggesting molecular protection in stroke development. Additionally, previous reports have shown that the β^S -globin gene cluster haplotypes are associated with an increase of stroke risk [23, 32, 37, 38]. In agreement with these reports, we showed that the presence of the CAR/CAR haplotype (present in 56 % of patients) was associated with stroke development in our population. Taken together, our findings and those reported by others suggest that only the β^S haplotypes and the $\alpha^{3.7kb}$ -thalassemia genotype may modulate the prevalence of stroke in SCA patients, independently of the ethnic background.

Intriguingly, our results suggest that there are haematological and molecular similarities between the patients who actually developed stroke (stroke positive) and those who present risk of disease development, without a history of stroke. One possible explanation for this observation is that, upon discovery of their risk of stroke from results of the TCD, patients in the stroke-risk group received medical intervention, such as hydroxyurea or chronic prophylactic blood transfusion therapies, which are widely known procedures that reduce the gravity of SCA and decrease the risk of stroke development [39–44]. Thus, these patients might have had a documented stroke event, which would place them in the stroke-positive group, had they not been treated with intervening therapies.

With respect to the *G6PD A⁻* variant genotype and the SNPs *TNF- α G308A*, *MTHFR C677T*, *PT G20210A*, and *FV Leiden G1691A*, no association was found in our cohort. Despite the low frequency of some SNPs, in particular those involving the factor V Leiden, prothrombin mutation, and *MTHFR* genes, we should not disregard previous studies, who observed a significant association with stroke development [14, 45–51]. Moreover, recent results from a meta-analysis demonstrated that *MTHFR* C667T genetic polymorphism [52] and *eNOS T786C* polymorphism [53] are associated with increased risk of ischaemic stroke in the general population. Although there is no similar study in SCA, it is conceivable that the same association may be applied to the SCA patients. In fact, our results showed that *eNOS T786C* polymorphism was associated with stroke development in stroke-positive patients older than 12 years. We should highlight that the enzyme encoded by the *eNOS* gene (endothelial nitric oxide, NO) plays a role in maintaining the homeostasis of the cerebral vasculature by inhibiting vascular smooth muscle contraction, platelet aggregation, and leukocyte adhesion to the endothelium [54], and a reduction of its levels was previously associated with pulmonary hypertension, priapism, leg ulcers, and stroke in SCA patients [55]. Therefore, evaluation of *eNOS T786C* polymorphisms and their prognostic impact will be of great interest in the context of homeostasis of the cerebral vasculature, helping to better understand the pathogenesis of stroke in SCA.

In summary, only the $\alpha^{3.7kb}$ -thalassemia genotype and the β^S haplotypes presented themselves as genetic modulators of the prevalence of stroke in our SCA population. Genetic heterogeneity between different populations could explain the lack of reproducibility between genetic association studies. These results justify the need for more studies and worldwide contribution to determine the true relevance and influence of different genetic polymorphisms on the prevalence and predictability of stroke from clinical features of SCA.

Acknowledgments

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE: grant #0513-2.02/10) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: grant #481904/2010-7).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- 1.Cajado C, Cerqueira BA, Couto FD, Moura-Neto JP, Vilas-Boas W, Dorea MJ et al (2011) TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine* 56:312–317
- 2.Steinberg MH (2009) Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Sci World J* 9:46–67
- 3.Stuart MJ, Nagel RL (2004) Sickle-cell disease. *Lancet* 364:1343–1360
- 4.Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW et al (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 91:288–294
- 5.Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH et al (1994) Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330:1639–1644
- 6.Taylor JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2008) Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One* 3:e2095
- 7.Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP (1997) Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 337:1584–1590
- 8.Chiang EY, Frenette PS (2005) Sickle cell vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 19:771–784, v
- 9.Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF (2009) Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 33:1–16
- 10.Balkaran B, Char G, Morris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR (1992) Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* 120:360–366
- 11.Wang WC, Langston JW, Steen RG, Wynn LW, Mulhern RK, Wilimas JA et al (1998) Abnormalities of the central nervous system in very young children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 132:994–998
- 12.Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W (1989) Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative study of sickle cell disease. *Pediatrics* 84:500–508
- 13.Stockman JA, Nigro MA, Mishkin MM, Oski FA (1972) Occlusion of large cerebral vessels in sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 287:846–849

- 14.Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L et al (2007) Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke* 38:2241–2246
- 15.Adams RJ (2005) TCD in sickle cell disease: an important and useful test. *Pediatr Radiol* 35:229–234
- 16.Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L et al (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood* 103:2391–2396
- 17.Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH (2005) Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet* 37:435–440
- 18.Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P et al (2007) Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke* 38:41–49
- 19.Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R et al (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 117:6681–6684
- 20.Driscoll MC, Hurler A, Styles L, McKie V, Files B, Olivieri N et al (2003) Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. *Blood* 101:2401–2404
- 21.Kwiatkowski JL, Hunter JV, Smith-Whitley K, Katz ML, Shults J, Ohene-Frempong K (2003) Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. *Br J Haematol* 121:932–937
- 22.Poggi V, Town M, Foulkes NS, Luzzatto L (1990) Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem J* 271:157–160
- 23.Powars DR (1991) Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am* 5:475–493
- 24.Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J (1993) Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{anti}$ $^{3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 83:105–111
- 25.Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH (1995) Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *Am J Hematol* 49:242–243
- 26.Data SA, Roltsch MH, Hand B, Ferrell RE, Park JJ, Brown MD (2003) eNOS T-786C genotype, physical activity, and peak forearm blood flow in females. *Med Sci Sports Exerc* 35:1991–1997
- 27.Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111–113

28. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM (1996) A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698–3703
29. Bandeira FM, Santos MN, Bezerra MA, Gomes YM, Araujo AS, Braga MC et al (2008) Family screening for HBB*S gene and detection of new cases of sickle cell trait in Northeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 42:234–241
30. Bezerra MA, Santos MN, Araujo AS, Gomes YM, Abath FG, Bandeira FM (2007) Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin* 31:83–88
31. Lyra IM, Goncalves MS, Braga JA, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad ST et al (2005) Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica* 21:1287–1290
32. Sarnaik SA, Ballas SK (2001) Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. *Am J Hematol* 67:179–182
33. Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Milton JN, Riva A, Dworkis DA et al (2010) Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am J Hematol* 85:29–35
34. Adams RJ, Kutlar A, McKie V, Carl E, Nichols FT, Liu JC et al (1994) Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 45:279–282
35. Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB (2010) Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* 34:516–529
36. Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W et al (2003) Alpha thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 25:622–628
37. Rusanova I, Cossio G, Moreno B, Javier PF, De Borace RG, Perea M et al (2011) β -Globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am J Hum Biol* 23:377–380
38. da Silva Filho IL, Leite AC, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, de Azevedo FC et al (2012) Reply: genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro. *Brazil Arq Neuropsiquiatr* 70:648–649
39. Brawley OW, Cornelius LJ, Edwards LR, Gamble VN, Green BL, Inturrisi C et al (2008) National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. *Ann Intern Med* 148:932–938

- 40.Lanzkron S, Strouse JJ, Wilson R, Beach MC, Haywood C, Park H et al (2008) Systematic review: hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. *Ann Intern Med* 148:939–955
- 41.Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A et al (2003) Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 289:1645–1651
- 42.Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 129:465–481
- 43.Lezcano NE, Odo N, Kutlar A, Brambilla D, Adams RJ (2006) Regular transfusion lowers plasma free hemoglobin in children with sickle-cell disease at risk for stroke. *Stroke* 37:1424–1426
- 44.Steinberg MH, McCarthy WF, Castro O, Ballas SK, Armstrong FD, Smith W et al (2010) The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5-year follow-up. *Am J Hematol* 85:403–408
- 45.Ariyaratnam R, Casas JP, Whittaker J, Smeeth L, Hingorani AD, Sharma P (2007) Genetics of ischaemic stroke among persons of non-European descent: a meta-analysis of eight genes involving approximately 32,500 individuals. *PLoS Med* 4:e131
- 46.Banerjee I, Gupta V, Ganesh S (2007) Association of gene polymorphism with genetic susceptibility to stroke in Asian populations: a meta-analysis. *J Hum Genet* 52:205–219
- 47.Casas JP, Hingorani AD, Bautista LE, Sharma P (2004) Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol* 61:1652–1661
- 48.Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C et al (2008) G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 112:4314–4317
- 49.Pereira TV, Rudnicki M, Franco RF, Pereira AC, Krieger JE (2007) Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: a meta-analysis. *Am Heart J* 153:821–830
- 50.Rubattu S, Speranza R, Ferrari M, Evangelista A, Beccia M, Stanzione R et al (2005) A role of TNF-alpha gene variant on juvenile ischemic stroke: a case-control study. *Eur J Neurol* 12:989–993
- 51.Niu PP, Yang G, Zheng BK, Guo ZN, Jin H, Yang Y (2013) Relationship between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and ischemic stroke: a meta-analysis. *Acta Neurol Scand* 128:202–212
- 52.Li P, Qin C (2013) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and susceptibility to ischemic stroke: a meta-analysis. *Gene* 535:359–64

- 53.Wang M, Jiang X, Wu W, Zhang D (2013) Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in Asian population: a meta-analysis. PLoS One 8:e60472
- 54.Katusic ZS, Austin SA (2014) Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. Eur Heart J (in press)
- 55.Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. Blood Rev 21:37–47

Currículo lattes atualizado

Diego Arruda Falcão

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Diego Arruda Falcão

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Investigação das Características Moleculares Associadas à Úlcera de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme, Ano de obtenção: 2014
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2008 - 2011** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Avaliação de Antígenos Aberrantes na Leucemia Linfóide Aguda do Adulto, em especial o CD25, Correlacionando com a Presença do BCR - ABL
Orientador: Dr^a. Cíntia Gonsalves de Faria Machado

Formação complementar

- 2012 - 2012** Extensão universitária em PCR em Tempo Real: Princípios Básicos e Aplicações.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

- 2012 - 2013** Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

Atividades

02/2013 - 05/2013 Especialização

*Especificação:
Total de 60h aula*

12/2012 - 04/2013 Graduação, Biomedicina

*Disciplinas ministradas:
Exames Hematológicos - 24h*

01/2008 - 12/2012 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas

Linhas de pesquisa:

Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme

Linhas de pesquisa

1. Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme
2. Avaliação de Antígenos Aberrantes na Leucemia Linfóide Aguda do Adulto, em especial o CD25, Correlacionando com a Presença do BCR - ABL

Áreas de atuação

1. Leucemias
2. Imunologia
3. Hematologia

Projetos

Projetos de pesquisa **2010 - 2012** Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme

Descrição: A anemia falciforme (AF) é caracterizada por manifestações clínicas graves como vaso-oclusão, crises dolorosas, úlcera de perna, priapismo e AVC. Complicações neurológicas ocorrem em até 25% dos pacientes com anemia falciforme. Estudos mostram que 28 a 38% dos pacientes com AF apresentam histórico de priapismo. Os fatores que predispõem os pacientes com anemia falciforme a essas complicações não estão bem estabelecidos. Existe, portanto, a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precoce possível. Estudos demonstram que pacientes falciformes apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF-alfa; O TNF-alfa; é uma citocina pró-inflamatória que favorece a fagocitose, o recrutamento de neutrófilos e a expressão da molécula de adesão VCAM-1. Estudos in vitro mostraram que o TNF-alfa; aumenta a aderência de hemácias falcizadas às células endoteliais dos vasos. Polimorfismos na região promotora do gene do TNF-alfa; (-308) (G-->A) e os SNPs (rs)2228088 (T-->G), localizado na região codificadora, e (rs)3093665 (C-->A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF-alfa; tem sido associados com a redução de eventos cerebrovasculares em pacientes com doença falciforme. A identificação de variáveis genéticas que são associadas com priapismo, pode portanto ajudar a definir mecanismos fisiopatológicos críticos não evidentes, assim como, identificar pacientes com risco aumentado. A presença de polimorfismos no gene da eNOS que acarreta em diminuição da atividade da enzima e conseqüente redução na biodisponibilidade de NO e portanto é de suma importância investigar uma possível associação entre o polimorfismo da eNOS e o priapismo na AF. SNPs no gene Klotho (KL) foram associados com o risco aumentado de priapismo. O objetivo geral desse trabalho é determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade de manifestações clínicas da anemia falciforme, como: o priapismo e o acidente vascular cerebral.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Diego Arruda Falcão (Responsável); ; Fernando Baltar de Oliveira; Betânia Lucena Domingos Hatzlhofer; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Aderson Silva Araújo; Igor de Farias

Domingos; Marília Siqueira Ramos Pinto; Antônio Carlos de Freitas; Fernanda Silva Medeiros; Tauane Mathias Pereira; Luana Priscilla Moraes Laranjeira; Raysa Samanta Moraes Laranjeira

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DOMINGOS, IGOR F., **FALCÃO, DIEGO A.**, HATZLHOFFER, BETANIA L., CUNHA, ANDERSON F., SANTOS, MAGNUN N., ALBUQUERQUE, DULCINÉIA M., FERTRIN, KLEBER Y., COSTA, FERNANDO F., AZEVEDO, RENATA C., MACHADO, CÍNTIA G., ARAÚJO, ADERSON S., LUCENA-ARAUJO, ANTONIO R., BEZERRA, MARCOS A.
Influence of the α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Annals of Hematology* (Print). , v.1, p.1 - , 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MARTINS, D. A. P., SOUZA, M. B. S., DOMINGOS, I. F., PEREIRA, TM, FALCÃO, D. A., HATZLHOFFER, B. L. D., ARAUJO, A. S., BEZERRA, M. A. C.
INFLUÊNCIA DA TALASSEMIA ALFA NO DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DE PERNAMBUCO. In: HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

2. MARTINS, D. A. P., DOMINGOS, I. F., FALCÃO, D. A., SILVA, J. L. C., HATZLHOFFER, B. L. D., ARAUJO, A. S., BEZERRA, M. A. C.
INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DA MTHFR C677T (MTHFR) NO DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DE PERNAMBUCO In: HEMO 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

3. PEREIRA, TM, MARTINS, D. A. P., FALCÃO, D. A., DOMINGOS, I. F., HATZLHOFFER, B. L. D., MENDONA, T. F., VASCONCELOS, L. R. S., CAVALCANTI, M. S. M., MOURA, P. M. M. F., BEZERRA, M. A. C.
INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS1225934 DO GENE BMP6 NA FISIOPATOGENESE DA OSTEONECROSE EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME EM PERNAMBUCO In: HEMO 2013, 2013, Brasília.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2013.

4. PEREIRA, TM, MENDONA, T. F., VASCONCELOS, L. R. S., HATZLHOFFER, B. L. D., DOMINGOS, I. F., FALCÃO, D. A., MOURA, P. M. M. F., CAVALCANTI, M. D. S. M., ARAUJO, A. S., BEZERRA, M. A. C.

Associação de Polimorfismos no gene bmp6 em pacientes com osteonecrose portadores de anemia falciforme In: Hemo 2012, 2012, Rio de Janeiro.

HEMO 2012. , 2012.

5. LIMA, A. S. M., QUINTAS, A. S. P., JUNIOR, C. H. R. C, FALCÃO, D. A., HATZLHOFFER, B. L. D., NEVES, M. A. B., ARAUJO, A. S., MACHADO, C. G. F., LUCENA-ARAUJO, A. R., BEZERRA, M. A. C.
Estudo de alterações genéticas e sua relação com dados clínico-laboratoriais em pacientes adultos com leucemia mielóide aguda da fundação hemo In: Hemo 2012, 2012, Rio de Janeiro.

HEMO 2012. , 2012.

6. FALCÃO, D. A., DOMINGOS, I. F., Laranjeira, L.P.M, Laranjeira, R.S.M, MARTINS, D. A. P., ARAUJO, N. B., HATZLHOFFER, B. L. D., ARAUJO, A. S., BEZERRA, M. A. C.

Influência da Talassemia α no Desenvolvimento de Úlceras de Membros Inferiores em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme no Estado de Pernambuco In: HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Influência da Talassemia e no Desenvolvimento de Úlceras de Membros Inferiores em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme no Estado de Pernambuco. , 2012.

7. FALCÃO, D. A., DOMINGOS, I. F., Laranjeira, L.P.M, Laranjeira, R.S.M, MARTINS, D. A. P., SILVA, R. R., MEDEIROS, FS, HATZLHOFER, B. L. D., ARAUJO, A. S., BEZERRA, M. A. C.

Influência do Polimorfismo da Região Promotora do Gene eNOS –786 (TC) no Desenvolvimento de Úlceras de Membros Inferiores em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme no Estado de Pernambuco In: HEMO 2012, 2012, Rio de Janeiro.

Influência do Polimorfismo da Região Promotora do Gene eNOS –786 (TC) no Desenvolvimento de Úlceras de Membros Inferiores em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme no Estado de Pernambuco. , 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. DOMINGOS, I. F., Laranjeira, L.P.M, FALCÃO, D. A., HATZLHOFER, B. L. D., BEZERRA, M. A. C. **Determinação de haplótipos beta-s em portadores de anemia falciforme do estado de pernambuco**, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

2. FALCÃO, D. A., DOMINGOS, I. F., HATZLHOFER, B. L. D., MARTINS, D. A. P., Laranjeira, R.S.M, BEZERRA, M. A. C.

Talassemia alfa como marcador molecular no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores em pacientes portadores de anemia falciforme no estado de pernambuco, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Tauane Mathias Pereira. **Associação de Polimorfismos no Gene BMP5 em Pacientes com Osteonecrose Portadores de Anemia Falciforme**. 2013. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

2. Diego Antonio Pereira Martins. **Investigação da Alfa Talassemia e dos Haplótipos beta-s no Desenvolvimento de Úlceras de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme**. 2013. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

3. Juan Luiz Coelho da Silva. **Investigação do Polimorfismo eNOS(T-786C) no Desenvolvimento de Úlcera de Membros Inferiores em Pacientes com Anemia Falciforme**. 2013. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

4. Ohanna Azevêdo Hirata. **Polimorfismo G-463A No Gene da Mieloperoxidase e Sua Associação com os Quadros Infeciosos em Pacientes com Anemia Falcimorme**. 2013. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Eventos**Participação em eventos**

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **II Jornada de Pós Graduação em Genética**, 2012. (Outra)
Talassemia alfa como marcador molecular no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores em pacientes portadores de anemia falciforme no estado de pernambuco.
2. **HEMO 2012**, 2012. (Congresso)