

**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética**

**MARIANA BARROS SOUTO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *BMP6* E *VDR* NA  
SUSCEPTIBILIDADE À OSTEONECROSE EM PACIENTES COM  
DOENÇA FALCIFORME**

**Recife - PE**

**2017**

**MARIANA BARROS SOUTO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *BMP6* E  
*VDR* NA SUSCEPTIBILIDADE À OSTEONECROSE EM  
PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME**

Dissertação de Mestrado 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

**Coorientador:** Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo

**Recife - PE**

**2017**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

Souza, Mariana Barros Souto de

Avaliação de polimorfismos nos genes BMP6 e VDR na susceptibilidade à osteonecrose em pacientes com doença falciforme / Mariana Barros Souto de Souza – Recife: O Autor, 2017.

66 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antônio Roberto Lucena de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Polimorfismo (Genética) 2. Genes 3. Osteonecrose I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador) II. Araújo, Antônio Roberto Lucena de (coorientador) III. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-256

**Mariana Barros Souto de Souza**

**Í Avaliação de polimorfismos nos genes *BMP6* e *VDR* na  
susceptibilidade à osteonecrose em pacientes com doença  
falciforme**

**Aprovado em 23/02/2017**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dra. Jaqueline Azevêdo**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Aderson Araujo**  
**Fundação de hematologia e hemoterapia de Pernambuco**

---

**Dr. Luydson Vasconcelos**  
**Centro de pesquisas Aggeu Magalhães**

**Recife - PE**

**2017**

**Dedico** esta dissertação primeiramente a Deus que sempre é meu alicerce em todos os momentos. E à minha família, meus pais e irmã, pelo amor e apoio incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me iluminou durante esta caminhada. A quem sou eternamente grata pelo dom da vida, do aprendizado e por seu amor imensurável.

Aos meus pais Carlos Frederico e Maria Elizabeth, pelo amor, dedicação, carinho e apoio despendido. Vocês são minha fortaleza e a inspiração que sempre me faz seguir em frente em busca dos meus sonhos. Amo muito vocês!

À minha irmã Beatriz, pelo amor, carinho, paciência e incentivo.

À minha família por sempre me apoiar. Em especial, meus avós, Giselha e Fernando, meu padrinho Paulo e minha madrinha Carol.

Aos professores Marcos André e Antonio Roberto, pelos ensinamentos passados, pelo incentivo, amizade e confiança que me foi dado. Obrigada por serem exemplos profissionais para mim. Foi uma honra ter vocês como mestres.

À todos que fazem parte do laboratório de hematologia clínica do labcen em especial à Mayara, Peu, Diego, Rayssa e Gabi pela amizade, paciência, brincadeiras e ensinamentos.

Aos amigos, Marcelle, Hugo, Ursula, Bia, Thamires, e aos amigos da Biomed que de uma forma ou de outra sempre torceram pelo meu sucesso e estavam junto comigo em todos os momentos. Obrigada pela amizade de sempre, Amo vocês.

À UFPE e a FACEPE/CNPq pela infra-estrutura oferecida para condução do mestrado e desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação Hemope pelo apoio clínico científico e aos pacientes participantes do projeto.

Obrigado à todos que contribuíram direta ou indiretamente desta conquista.

**Í Aqui no entanto nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. Porque somos curiosos... E a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.**

**Siga em frente!**

**Walt Disney**

## RESUMO

A osteonecrose é uma complicação crônica e progressiva da doença falciforme (DF) e ocorre devido à vaso-oclusão na microcirculação óssea, com infarto das superfícies articulares. Sabendo que a ocorrência da osteonecrose possui uma base multifatorial, polimorfismos de diversos genes, dentre eles o *BMP6* e o *VDR*, têm sido bastante estudados. Pois participam diretamente do metabolismo ósseo. Assim o objetivo do nosso trabalho foi avaliar se existe associação entre polimorfismos nos genes *BMP6* e *VDR* com o desenvolvimento da osteonecrose nos pacientes com DF. O estudo foi conduzido por comparação de grupos numa amostra de 303 pacientes com DF, divididos em 105 casos (83 HbSS, 11 HbSC, 11 HbSβ), os pacientes com osteonecrose e 198 controles (114 HbSS, 51 HbSC e 33 HbSβ) pacientes acima de 18 anos e que não apresentaram manifestações clínicas. Foram selecionados seis polimorfismos do *BMP6* (rs3812163, rs270393, rs1225934, rs449853, rs267196, rs267201) e dois do *VDR* (*FokI* e *Cdx2*). A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan®. Apenas os rs3812163 (T>A) e rs267201 (A>G) do *BMP6* mostraram-se associados ao desenvolvimento de osteonecrose ( $P < 0,0001$ ). Juntamente com o *FokI* ( $P = 0,024$ ) e com o *Cdx2* ( $P = 0,046$ ), aparecem como fatores de proteção contra o desenvolvimento da osteonecrose. A compreensão desses fatores de risco genéticos para o desenvolvimento da osteonecrose torna-se necessária para fornecer novos conhecimentos sobre a patogênese desta doença e, oferecer oportunidades para seu tratamento, que atualmente é limitado.

**Palavras-chave:** Doença falciforme. Fatores genéticos. Necrose avascular. Proteína morfogênica óssea. Receptor de vitamina D.



## ABSTRACT

Osteonecrosis is a chronic and progressive complication of sickle cell disease (SCD) and occurs due to vaso-occlusion in the bone microcirculation, with infarction of the articular surfaces. Knowing that the occurrence of osteonecrosis has a multifactorial basis, polymorphisms of several genes, among them BMP6 and VDR, have been well studied. Because they participate directly in bone metabolism. Thus the objective of our study was to evaluate if there is an association between polymorphisms in BMP6 and VDR genes with the development of osteonecrosis in patients with SCD. The study was conducted by comparing a sample group of 303 patients with SCD divided in 105 cases (83 HBSS 11 HbSC, 11 HbS $\beta$ ), patients with osteonecrosis and 198 controls (114 HBSS HbSC 51 and 33 HbS $\beta$ ), patients over 18 years of age and who did not present clinical manifestations. Six BMP6 polymorphisms (rs3812163, rs270393, rs1225934, rs449853, rs267196, rs267201) and two within VDR (*FokI* and *Cdx2*) were selected. Polymorphism genotyping was performed by real-time PCR using TaqMan®. Only rs3812163 (T> A) and rs267201 (A> G) of BMP6 were shown to be associated with the development of osteonecrosis ( $P < 0.0001$ ). Together with *FokI* ( $P = 0.024$ ) and *Cdx2* ( $P = 0.046$ ), they appear as protective factors against the development of osteonecrosis. Understanding these genetic risk factors for the development of osteonecrosis becomes necessary to provide new insights into the pathogenesis of this disease and provide opportunities for its treatment, which is currently limited.

**Keywords:** Sickle cell disease. Genetic factors. Avascular necrosis. Bone morphogenic protein. Vitamin D receptor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Distribuição nacional da frequência do alelo  $\beta^S$ . 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). **19**
- Figura 2:** Processo de polimerização da hemoglobina S na hemácia falciforme (Ministério da saúde, 2012). **21**
- Figura 3.** Radiografia com osteonecrose bilateral na cabeça do fêmur em paciente com doença falciforme (SILVA JUNIOR et al. 2012). **24**
- Figura 4.** Via canônica de sinalização da BMP6 (NGUYEN et al.,2014). **27**
- Figura 5.** Gene *BMP6*, demonstrando os íntrons e éxons e seus polimorfismos estudados neste trabalho (Autoria própria). **29**
- Figura 6.** Metabolismo da vitamina D (INDA FILHO & MELAMED, 2013) **30**
- Figura 7 -** A interação entre a vitamina D e a célula alvo na glândula paratireoide (LANDRY et al, 2011). **31**
- Figura 8:** Gene *VDR*, demonstrando os íntrons e éxons e seus polimorfismos mais frequentemente estudados (*cdx2*, *FokI*, *BsmI*, *TaqI* e *Apal*). (Uitterlinden, 2004). **32**
- Figura 9.** Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *BMP6* (rs3812163). **46**
- Figura 10.** Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *BMP6* (rs267201). **46**
- Figura 11.** Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *VDR* (rs2228570). **47**
- Figura 12.** Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *VDR* (rs11568820). **48**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estágios da osteonecrose da cabeça do fêmur proposto por Ficat.	<b>23</b>
<b>Tabela 2.</b> Seqüências dos <i>primers</i> para pesquisa da deleção $\alpha$ 3.7kb e localização referente ao gene $\alpha$ no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).	<b>37</b>
<b>Tabela 3.</b> Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com anemia falciforme (HbSS) de acordo com a ocorrência de osteonecrose.	<b>40</b>
<b>Tabela 4.</b> Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes S $\beta$ de acordo com a ocorrência de osteonecrose.	<b>42</b>
<b>Tabela 5.</b> Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes SC de acordo com a ocorrência de osteonecrose.	<b>43</b>
<b>Tabela 6.</b> Frequencia observada dos SNPs dos genes <i>BMP6</i> e <i>VDR</i> para os pacientes HbSS.	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Item</b>	<b>Definição</b>
$\alpha$	Alfa
$\alpha\alpha$	Haplótipo alfa normal
$\alpha$ 3.7	Deleção alfa 3.7kb
$\beta$	Beta
$\beta^s$	Globina Beta falciforme
$\mu$ l	Microlitro
A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
Arg	Arginina
AS	Antisense
AST	Aspartato transaminase
AVC	Acidente vascular cerebral
BI	Bilirrubina indireta
BMP	Do inglês, <i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	Do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>
C	Citosina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CNS	Conselho nacional de saúde
CVO	Crise vaso-oclusiva
DF	Doença Falciforme
DHL	Lactato desidrogenase
DMO	Densidade mineral óssea
DMSO	Dimetil sulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FA	Fosfatase Alcalina
G	Guanina
Hb	Hemoglobina
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina A2
HbF	Hemoglobina Fetal
HCl	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HbS	Hemoglobina S
HEMOPE	Fundação de hematologia e hemoterapia de Pernambuco
HPLC	Do inglês, High Performance Liquid Chromatography
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
IC	Intervalo de confiança
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
KDa	Kilodáton
MAF	Do inglês, <i>minor allele frequency</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NaCl <sub>2</sub>	Cloreto de sódio
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de amônio

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amônio
OR	<i>Odds ratio</i>
P	Significância
pb	<i>Pares de base</i>
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PTH	Paratormônio
RFLP	Do inglês, <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RMN	Ressonância magnética
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Do inglês, <i>Real time - quantitative polymerase chain reaction</i>
Rx	Raio-x
S	Sense
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEN	Senegal
SMAD	Derivado de uma definição homóloga do gene Mad em drosófilas
SNP	Do inglês, <i>Single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome torácica aguda
T	Timina
TC	Tomografia computadorizada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	Fator transformante do crescimento β
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UFPE	Universidade federal de Pernambuco
UNILAB	Unidade de laboratórios especializados

UVB	Ultra violeta tipo B
Val	Valina
VDR	Do inglês, <i>Vitamin D receptor</i>
VDRE	Do inglês, <i>Vitamin D response element</i>
25(OH)D	Hidrocolecalciferol
[1,25(OH) <sub>2</sub> D]	1 $\alpha$ -25 diidrocolecalciferol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	17
<b>2</b>	<b>Revisão da Literatura</b>	19
<b>2.1</b>	<b>Doença falciforme</b>	19
<b>2.2</b>	<b>Osteonecrose</b>	22
<b>2.3</b>	<b>Moduladores Genéticos</b>	25
<b>2.3.1</b>	<b>Talassemia alfa (<math>\alpha</math>)</b>	25
<b>2.3.2</b>	<b><i>BMP6</i></b>	26
<b>2.3.3</b>	<b><i>VDR</i></b>	29
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	34
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	34
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	34
<b>4</b>	<b>Material e Métodos</b>	35
<b>4.1</b>	<b>Casuística</b>	35
<b>4.2</b>	<b>Desenho de estudo</b>	35
<b>4.3</b>	<b>Aspectos éticos</b>	36
<b>4.4</b>	<b>Análise hematológica e clínica</b>	36
<b>4.5</b>	<b>Análise molecular</b>	36
<b>4.5.1</b>	<b>Extração do DNA genômico</b>	36
<b>4.5.2</b>	<b>Avaliação dos moduladores moleculares</b>	37
<b>4.5.3</b>	<b>Análise dos polimorfismos dos genes <i>BMP6</i> e <i>VDR</i></b>	37
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística</b>	38
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	39
<b>6</b>	<b>Discussão</b>	49
<b>7</b>	<b>Conclusão</b>	56
	<b>Referências Bibliográficas</b>	57
	<b>Anexos</b>	62
	<b>Curriculo Lattes</b>	66



## 1 INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma das desordens hereditárias mais comuns do mundo, e representa um conjunto de combinações de hemoglobinas modificadas que causam anemia, sendo, pelo menos, uma do tipo HbS. Suas formas mais comuns estão associadas com a hemoglobina C (HbSC) e com a talassemia beta (HbS $\beta$ ). Possuem um quadro clínico heterogêneo que varia de um fenótipo mais leve até quadros graves de crises de dor e manifestações clínicas debilitantes semelhantes às da anemia falciforme.

A fisiopatologia da DF tem como cerne a capacidade de polimerização da HbS desoxigenada, sendo a vaso-oclusão e a hemólise os principais mecanismos envolvidos. Quando ocorrem em pequenos vasos, compõe um conjunto de fatores fisiopatológicos determinantes da grande maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes com DF, tais como complicações neurológicas, acidente vascular cerebral (AVC); síndrome torácica aguda (STA), priapismo, úlceras de perna e a osteonecrose.

A osteonecrose decorre do infarto das superfícies articulares, devido a vaso-oclusão na microcirculação óssea, caracterizando assim uma importante causa de morbidade na DF. A osteonecrose, ou necrose avascular, é uma complicação crônica e progressiva na DF, com prevalência variável entre os pacientes, sendo mais comum em adultos. Apesar de algumas evidências mostrarem uma contribuição genética no desenvolvimento da osteonecrose, os resultados ainda são bastante controversos, apontando para necessidade da identificação e estudo aprofundado de marcadores genéticos que auxiliem na distinção destes pacientes.

As proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), são proteínas estruturalmente relacionadas com o fator transformante do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e desempenham um importante papel na formação óssea, juntamente com a vitamina D, um regulador da homeostase do cálcio, que atua na via receptor da vitamina D (VDR). Ambos estão ligados diretamente ao metabolismo ósseo. O BMP6, associado à indução da formação óssea endocondral e homeostase da cartilagem; e o VDR promovendo a absorção intestinal do cálcio. Dessa forma, polimorfismos nestes genes promovem alterações em suas funções, levando a cenários variados de atuação, resultando em complicações metabólicas nos indivíduos afetados.

Nossa hipótese é que indivíduos portadores de DF que apresentam polimorfismos nos genes *BMP6* e *VDR* tenham um maior comprometimento do tecido ósseo, predispondo a uma maior frequência de osteonecrose e assim, um pior curso clínico. Com os resultados obtidos deste trabalho esperamos identificar quais os principais polimorfismos nestes genes que estão associados a complicações osteoarticulares na DF.

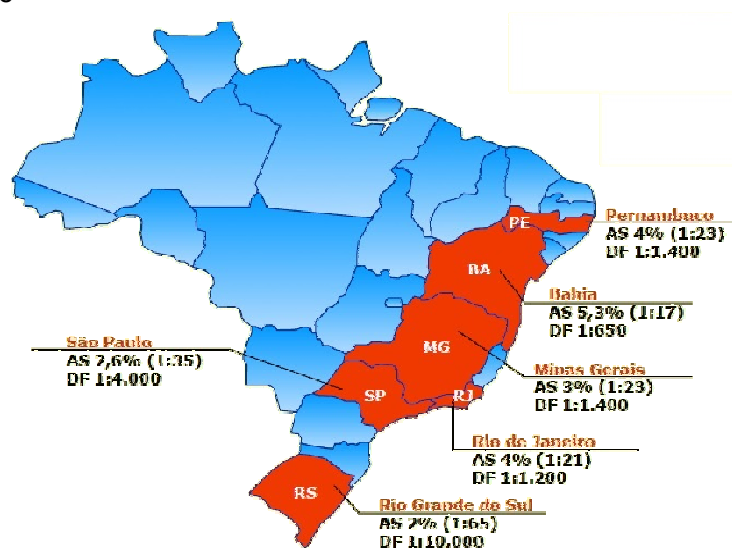
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doença Falciforme

A doença falciforme (DF) é uma desordem hereditária, caracterizada pela associação da hemoglobina S (HbS) a outra alteração estrutural, ou talassêmica, da hemoglobina (Hb). As associações mais comumente encontradas são com a Hb C (SC), com a beta talassemia (S- $\beta$ ) e com a Hb D (SD). Os heterozigotos da HbS (AS) são, via de regra, assintomáticos (SONATI & COSTA, 2008a; STEINBERG, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 270 milhões de pessoas possuem genes determinantes de hemoglobinas variantes e que a cada ano nascem 300.000 crianças com DF. É a doença hereditária mais prevalente no Brasil, afetando de 25.000 a 30.000 pessoas. A incidência estimada da DF no estado de Pernambuco é 1:1.400 recém-nascidos, ocorrendo predominantemente entre afrodescendentes (CANÇADO & JESUS, 2007a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; SOARES et al., 2014) (Figura 1).

**Figura 1** - Distribuição nacional da frequência do alelo  $\beta$ S. 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



Fonte: Cançado & Jesus (2007)

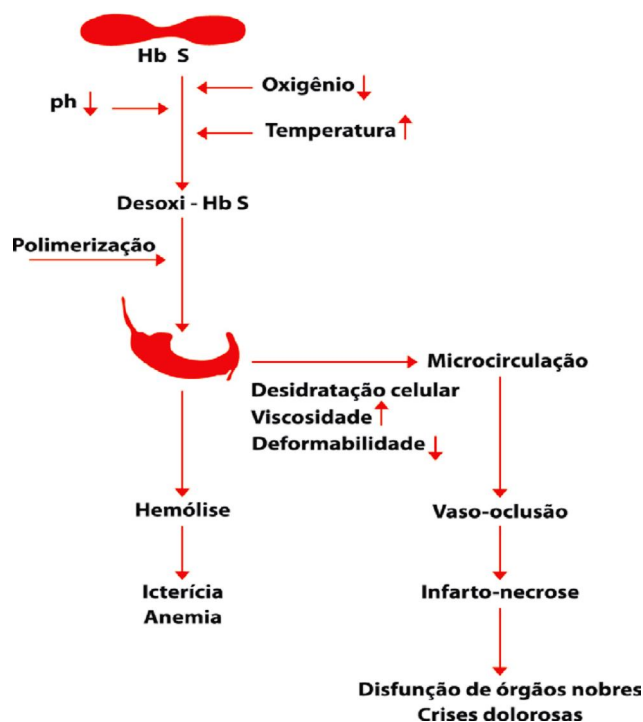
Assim, a anemia falciforme (AF) (HbSS) é a doença hereditária monogênica mais comum no mundo (CANÇADO & JESUS, 2007b). Estima-se que 5-6% da população brasileira seja portadora do alelo  $\beta^s$  e que, 700-1000 crianças portadoras da AF nasçam a cada ano (LYRA et al., 2005).

A HbS é originada a partir de uma mutação pontual no gene da globina  $\beta$ , que promove a substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição da cadeia  $\beta$  globínica (*HBB*;  $\beta^6$  GAG→GTG; glu<sup>6</sup>→val<sup>6</sup>). Em condições específicas, como baixas tensões de oxigênio, a HbS pode polimerizar-se, formando estruturas filamentosas que se depositam nas membranas das hemácias, levando a alterações funcionais e estruturais, tornando-as falciformes (CONRAN et al., 2009a; SONATI & COSTA, 2008b; ZHOU et al., 2011).

A fisiopatologia das DF é baseada na capacidade de polimerização da HbS desoxigenada. Estudos de cinética da polimerização demonstraram que a formação do polímero está diretamente relacionada à quantidade de hemoglobina, demonstrando o papel crucial da concentração de HbS no processo da falcização (DE et al., 2011; MAWANI & FRENETTE, 2013a).

O fenômeno de polimerização também promove lesão celular. Em larga escala, eritrócitos danificados promovem efeitos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando os fenótipos da DF (STEINBERG, 2008) (Figura 2).

Os eventos vaso-oclusivos na microcirculação resultam de um cenário complexo e parcialmente descrito, que envolve interações entre eritrócitos falcizados e outros componentes presentes no sangue (proteínas da coagulação, células endoteliais, leucócitos e plaquetas) (CONRAN et al., 2009b; LANARO et al., 2009; PLATT, 2008a).

**Figura 2** - Processo de polimerização da hemácia falciforme

Fonte: Ministério da saúde (2012)

Estudos usando ensaios de adesão *in vitro* observaram o papel das hemácias falciformes no processo da vaso-oclusão. A adesão de hemácias e reticulócitos ao endotélio na microcirculação, leva ao aprisionamento dos eritrócitos mais densos, senescentes e disformes resultando numa redução do fluxo sanguíneo (KAUL et al., 2009a; MANWANI & FRENETTE, 2013b).

Além disto, pacientes com DF têm mostrado uma intensa ativação da coagulação sanguínea, com aumento da atividade plaquetária e consumo dos inibidores da coagulação, caracterizando um estado de hipercoagulabilidade, especialmente durante as crises vaso-oclusivas (COLELLA et al., 2015a; LIM et al., 2013; NISHANK et al., 2013).

Assim, dentre as principais complicações clínicas, que contribuem para a morbidade na doença, temos: complicações neurológicas, dentre elas o acidente vascular cerebral (AVC); síndrome torácica aguda (STA); priapismo; úlceras de perna e a osteonecrose (DRISS *et al.*, 2009; KATO *et al.*, 2007; PLATT, 2008b).

As DF (SC e S $\beta$ -tal) possuem quadros clínicos que podem ter apresentação mais benigna que o da AF, com anemia hemolítica de menor intensidade e, ocasionalmente, esplenomegalia. No entanto, a associação da HbS com a talassemia  $\beta^0$ , possui um quadro clínico mais grave e leva à manifestações clínicas bastante similares àquelas da AF. Nos pacientes SC, por apresentarem uma maior viscosidade sanguínea, outras complicações bastante observadas são: a osteonecrose e a retinopatia proliferativa, que é mais grave do que na anemia falciforme (COLELLA et al., 2015b; MELO-REIS et al., 2006; SONATI & COSTA, 2008c).

## **2.2 Osteonecrose**

Aproximadamente 80% dos pacientes portadores da DF apresentam comprometimento ósteo-articular. Dentre as diversas manifestações ósseas da DF (osteomielite, osteopenia e osteoporose) uma das mais frequentes e graves é a osteonecrose ou necrose avascular, sendo esta a que mais compromete a qualidade de vida dos pacientes acometidos (DALTRO et al., 2011a; PICOT et al., 2014).

A osteonecrose, ou necrose avascular, é uma complicação crônica e progressiva na DF com prevalência variável entre os pacientes, sendo mais comum em adultos. É caracterizada como um infarto das superfícies articulares com conseqüente degeneração e destruição da cartilagem articular. Constitui uma importante causa de morbidade na DF, contudo, sua patogênese segue desconhecida (LEMONNE et al., 2013; SILVA JUNIOR, DAHER & ROCHA 2012).

Diversos trabalhos apontam a obstrução intravascular como um dos principais mecanismos para o desenvolvimento da osteonecrose. Na doença falciforme a oclusão do suprimento arterial para o osso subcondral, causado

pelas hemácias falcizadas, dá início a uma série de micro-infartos que, repetidos cronicamente, determinam o surgimento da osteonecrose epifisária. (AKINYoola et al., 2008a; ALMEIDA & ROBERTS, 2005a; SILVEIRA et al., 2010a).

Outros estudos postularam que a causa básica da necrose associada a esse tipo de hemoglobinopatia é a hiperplasia medular, que ocorre como resposta à anemia crônica, causando aumento da pressão hidrostática nos vasos intramedulares e comprometendo a circulação intra-óssea. Atualmente, existe consenso sobre a etiologia multifatorial, com associação de fatores genéticos e ambientais, como determinante no desenvolvimento da osteonecrose associada à doença falciforme (SILVEIRA et al., 2010b; SORICH et al., 2015; WINGATE et al., 1996).

De acordo com a evolução da osteonecrose e a forma de diagnóstico adequado, Ficat (1985) desenvolveu um conhecido método de avaliação, para que o acompanhamento dos pacientes possa ser feito com maior precisão, a fim de determinar a melhor forma de tratamento (Tabela 1).

**Tabela1** - Estágios da osteonecrose da cabeça do fêmur proposto por Ficat.

<b>Estágio</b>	<b>Diagnóstico</b>
<b>0</b>	Ressonância magnética (RMN) normal (osteonecrose só pode ser evidenciada através de corte histológico)
<b>I</b>	Raio-x e Tomografia computadorizada (TC) normais; osteonecrose identificada apenas por RMN
<b>II</b>	Raio-x identifica esclerose e lesões líticas
<b>III</b>	Raio-x identifica achatamento da cabeça do fêmur e lesão crescente
<b>IV</b>	Raio-x identifica colapso da cabeça do fêmur, redução da região articular e osteoartrite

Fonte: Ficat (1985)

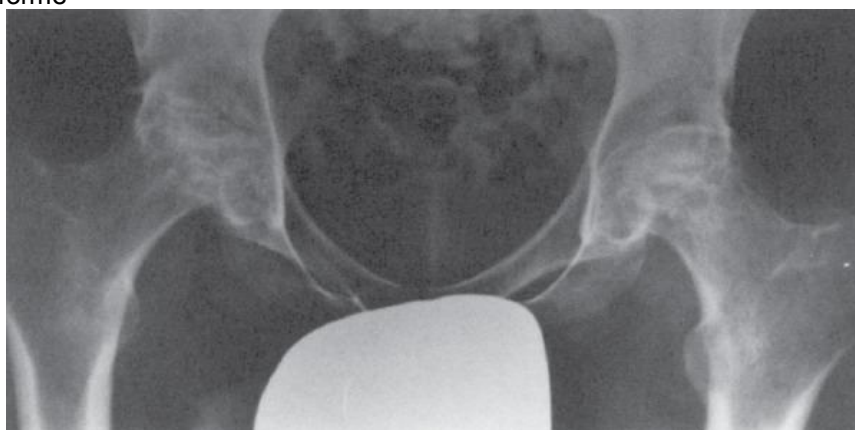
Comumente, esta complicação apresenta um diagnóstico tardio, quando os pacientes já apresentam limitação na locomoção, restando apenas, como

tratamento, a analgesia paliativa ou uma intervenção cirúrgica que, na maioria dos casos, conduz a um evidente desconforto pós-cirúrgico (AKINYoola et al., 2008b; MARSH et al., 2015a).

A osteonecrose em seu estágio avançado pode ser facilmente diagnosticada através da radiografia simples (Figura 3), embora a doença no estágio inicial seja melhor diagnosticada por ressonância magnética (RMN). Quando não tratada, cerca de 87% dos pacientes progridem para o total colapso das cabeças femorais dentro de 5 anos após o diagnóstico (ALMEIDA & ROBERTS, 2005b).

Seu diagnóstico diferencial inclui infecções (osteomielite e/ou pio-artrite), neoplasias ósseas benignas ou malignas, doença degenerativa articular e as osteonecroses secundárias a outras etiologias; Como por exemplo: administração de esteroides, alcoolismo e doenças auto-imunes, principalmente lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide. Caso não haja nenhum destes, ela é classificada como idiopática (SILVEIRA et al., 2010c; ZALAVRAS et al., 2002).

**Figura 3** - Radiografia com osteonecrose bilateral na cabeça do fêmur em paciente com doença falciforme



Fonte: SILVA JUNIOR et al (2012)

Os mecanismos envolvidos na patogênese da osteonecrose em pacientes com doença falciforme não estão bem estabelecidos. Ela pode variar em frequência e gravidade, devido aos efeitos dos genes que modificam a



fisiopatologia da doença iniciada pela mutação falciforme (BALDWIN et al., 2005a). Dessa forma, fatores ambientais e genéticos têm sido usados para explicar essa diversidade fenotípica (BELISÁRIO et al., 2010a).

Dentre esses fatores, os mais conhecidos são a coexistência com a talassemia alfa, haplótipos do cluster beta e a concentração da hemoglobina fetal, mas estes não são suficientes para elucidar as diferentes expressões fenotípicas observadas nos pacientes com DF (LETTRE et al., 2008a).

## **2.3 Moduladores Genéticos**

### **2.3.1 Talassemia alfa ( $\alpha$ )**

A talassemia alfa ( $\alpha$ ) constitui um grupo de doenças hereditárias de distribuição mundial, causadas pela deficiência da síntese de cadeias alfa da hemoglobina. Podendo ser decorrente de deleções ou mutações pontuais nos genes  $\alpha 1$  e /ou  $\alpha 2$  (BELISARIO et al, 2010b; HIGGS, 2013a).

A talassemia  $\alpha 1$  ou  $\alpha 0$  é caracterizada pela perda de dois genes  $\alpha$  no mesmo cromossomo ( $--/\alpha\alpha$ ) e, a talassemia  $\alpha^2$  ou  $\alpha^+$  é representada pela perda de um dos genes  $\alpha$  em pelo menos um dos cromossomos ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) (HIGGS 2013b). Dentre as causas de talassemia alfa, a  $\alpha^2$  mostra-se como mais frequente, apresentando dois tipos de deleções, a de 3.7Kb e de 4.2Kb (DODE et al., 1993).

A co-herança da talassemia alfa ( $\alpha$ ) com a DF tem como consequência a redução do volume corpuscular médio (VCM), um menor número de reticulócitos e menor grau de hemólise, devido a redução da hemoglobina corpuscular média (HCM), conferindo assim uma melhora nos parâmetros hematológicos da doença (HASSAN et al., 2014a).

Por diminuir a hemólise, a associação da talassemia alfa com a DF, protege contra fenótipos associados com os processos hemolíticos, como úlcera maleolar, priapismo e acidente vascular cerebral (DOMINGOS et al., 2014; KATO et al., 2007).

Os benefícios na evolução clínica que essas alterações, principalmente a redução na concentração da hemoglobina intracelular podem produzir, ainda não estão completamente estabelecidos. Aparentemente úlceras de perna, acidente vascular cerebral e anormalidades na retina são menos frequentes em pacientes com talassemia alfa. Porém, estudos relataram que a talassemia alfa, idade, hematócrito elevado, trombofilia, e freqüentes eventos vaso oclusivos são fatores de risco para o desenvolvimento da osteonecrose (ADEKILE et al., 2001a; AKINYOOOLA et al., 2009c; BALLAS et al., 1989a).

Sendo assim, a co-herança com a talassemia alfa ( $\alpha$ ), pode conduzir a manifestações fenotípicas distintas, que devem ser analisadas individualmente, de acordo com o quadro clínico apresentado (HASSAN et al., 2014b).

Além dos moduladores moleculares clássicos, várias linhas de pesquisa sugerem que existe uma influência genética no desenvolvimento de osteonecrose em portadores de DF. Desse modo, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) têm sido investigados, em genes candidatos (*Klotho*, *BMP6*, *Annexina A2*, dentre outros) e assim, associados às diversas manifestações clínicas da DF, incluindo a osteonecrose (ARLET et al., 2013; BALDWIN et al., 2005b; FERTRIN & COSTA, 2010; LETTRE et al., 2008b; ULUG et al., 2009a).

### **2.3.2 BMP6**

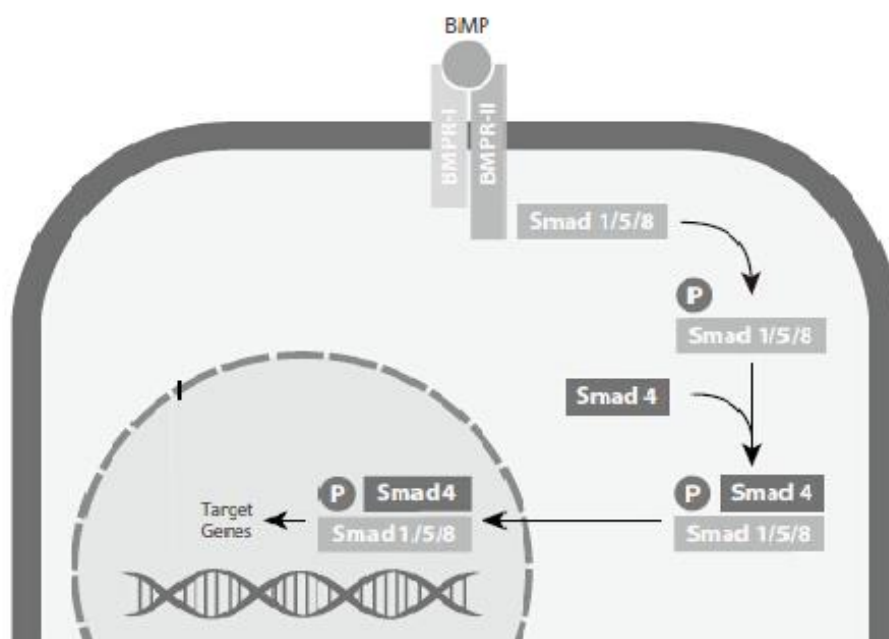
As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), membros da superfamília TGF-beta, são citocinas multifuncionais envolvidas em vários aspectos no desenvolvimento de tecidos e na sua morfogênese (WANG et al., 2014a).

É bem documentado que as BMPs orquestram uma ampla gama de processos, incluindo a diferenciação induzida por BMP de células progenitoras de osteoblastos e o subsequente desenvolvimento ósseo em adultos, desenvolvimento do esqueleto, modelação neuronal e formação de membros em embriões (ABHISHEK et al., 2010a).

As BMP6 são proteínas pleiotrópicas, possuem seu gene localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p24-p23) com 7 exóns e 6 íntrons. Apresentam-se envolvidas em processos inflamatórios e como importante modulador da formação óssea, juntamente com o paratohormônio e a vitamina D, sendo capaz de induzir formação óssea endocondral, quando implantadas em sítios ectópicos (BALDWIN et al., 2005c; CHAOUCH et al., 2013a; SAMMONS et al., 2004).

A principal via de sinalização do BMP6 é a via canônica dependente de SMADS. O BMP6 inicia a cascata de transdução de sinal através da ligação a receptores do tipo serina/treonina quinase (Figura 4).

**Figura 4** - Via canônica de sinalização do BMP6.



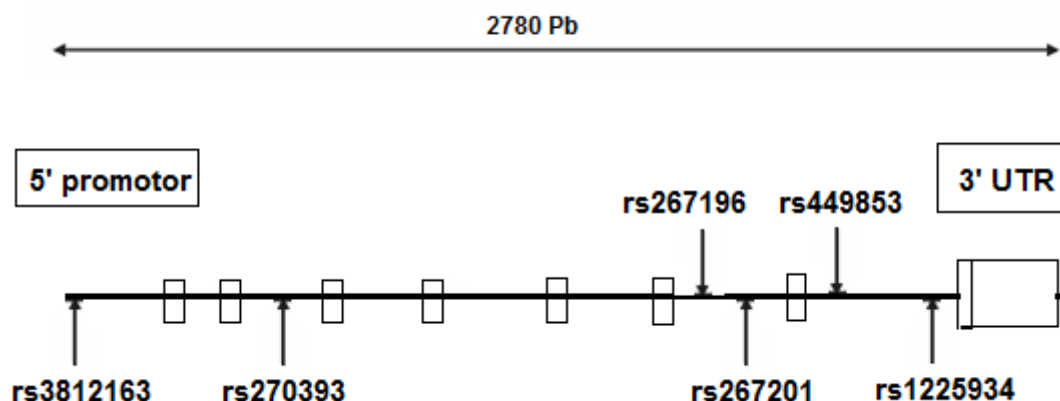
A BMP6 interage com receptores tipo II e recruta os receptores do tipo I formando um complexo heterotetramérico. O receptor constitutivamente ativa o tipo II, e em seguida, transfosforila o receptor de tipo I. Posteriormente o receptor de tipo I fosforila um conjunto de SMADS conhecido como R-smads (Smad 1/5/8). Depois de fosforilada as R-Smads se associam com a co-Smad (Smad4), e esse complexo transloca-se para o núcleo, onde juntamente com outros coativadores ou co-repressores regulam a expressão gênica (ABHISHEK et al., 2010b, WANG et al., 2014b).

Estudos anteriores observaram o papel do *BMP6* na homeostase da cartilagem e evidenciaram um envolvimento essencial deste gene na reparação/manutenção da cartilagem articular humana. (BOBACZ et al., 2003; KAYABASI et al., 2013). Além disso, estudos in vivo observaram que ratos *Bmp6*<sup>-/-</sup> possuem perda óssea grave e mostram o tamanho reduzido dos ossos longos e atraso na ossificação esternal (VUKICEVIC & SAMPATH, 2009a; WANG et al., 2014c).

Na osteonecrose falciforme, a degeneração progressiva do osso acaba levando ao seu colapso e destruição da cartilagem articular, apoiando um papel do BMP6 na patogênese dessa complicação (ULUG et al., 2008b). Assim, o gene *BMP6* torna-se promissor na compreensão dos fenômenos ósseos devido ao seu papel no metabolismo.

Seis polimorfismos no gene *BMP6* rs3812163 (A>T), rs270393 (C>T), rs1225934 (C>A), rs449853 (C>T), rs267196 (A>T), rs267201 (A>G) foram previamente associados com o desenvolvimento de osteonecrose em portadores de anemia falciforme (Figura 5) (BALDWIN et al., 2005d; CHAOUCH et al., 2013b; ULUG et al., 2008c).

**Figura 5** - Gene *BMP6*, demonstrando os íntrons e éxons e seus polimorfismos estudados neste trabalho.



Fonte: Autoria própria

O *BMP6* também foi associado com outras complicações vasculares na DF, tais como priapismo e acidente vascular cerebral, sugerindo uma base molecular subjacente comum para estas complicações vasculares (NOLAN et al., 2005; SEBASTIANI et al., 2005).

### 2.3.3 VDR

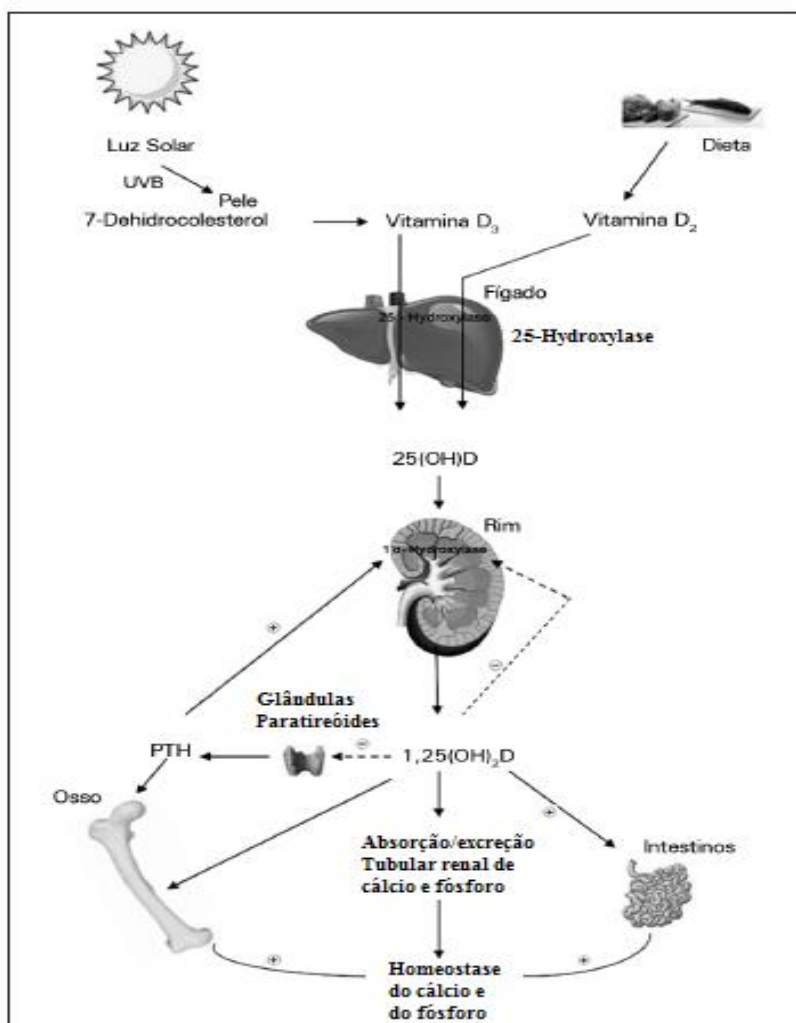
Juntamente com as BMPs, a vitamina D desempenha um importante papel no metabolismo ósseo, promovendo a absorção intestinal do cálcio, via interação com o seu receptor (VDR) (YUFEI et al., 2012).

A vitamina D é um hormônio esteróide lipossolúvel. Sua forma ativa é produzida principalmente por via endógena, onde o 7-desidrocolesterol localizado na pele é convertido em Colecalciferol pela ação dos raios solares UVB. Apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação. (BIKLE et al., 2014; CASTRO, 2011a; HUOTARI & HERZIG, 2008).

Todos os derivados do colecalciferol são lipossolúveis e circulam principalmente ligados a uma  $\alpha$ -globulina, a Proteína Ligadora da Vitamina D (DBP), que transporta estas moléculas hidrofóbicas a vários órgãos-alvo. No

fígado, o colecalciferol é convertido em 25(OH)D pela hidroxilação no seu carbono 25. No rim, a enzima 25(OH)1 $\alpha$ -hidroxilase (1 $\alpha$ -OHase), converte 25(OH)D em 1 $\alpha$ ,25 diidroxicolecalciferol [1,25 (OH)<sub>2</sub>D], que é a forma ativa deste hormônio (Vitamina D3) (Figura 6) (INDA FILHO & MELAMED, 2013; PREMAOR & FURLANETTO, 2006).

**Figura 6** - Metabolismo da vitamina D.

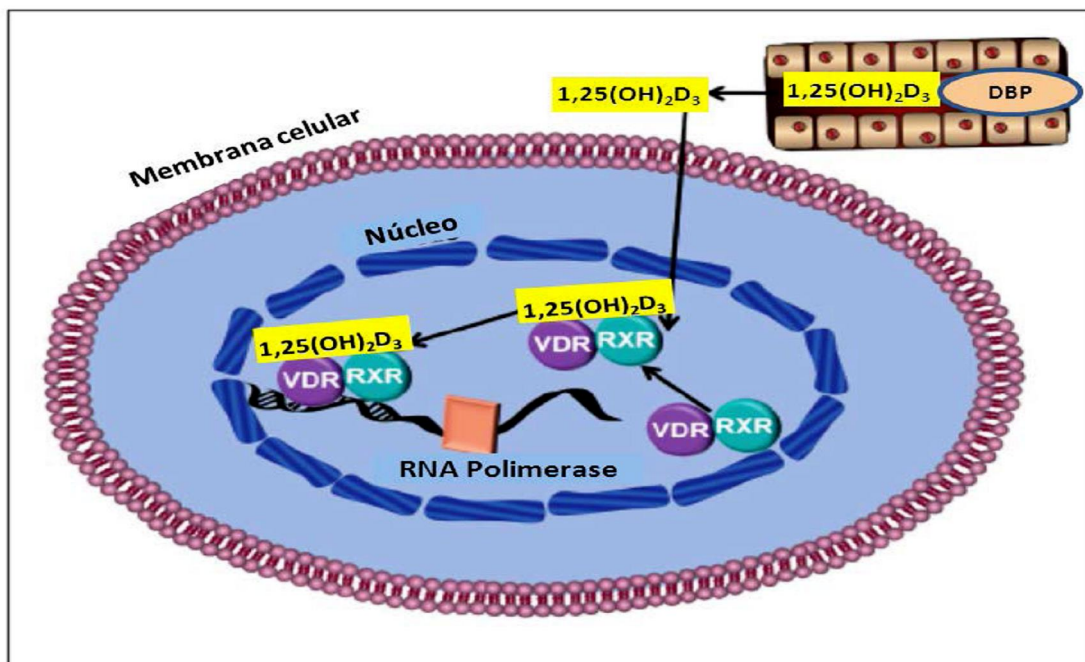


Fonte: Adaptado de: INDA FILHO & MELAMED (2013)

As ações da vitamina D3 são mediadas pelo receptor da vitamina D (VDR), o qual é caracterizado por ser um receptor nuclear de 50 kDa, pertencente à família dos receptores esteróides de classe 2, que atua como um fator de transcrição dependente de ligante. O VDR é expresso em quase

todas as células humanas e parece participar, direta ou indiretamente, da regulação de cerca de 3% do genoma humano (Figura 7) (CASTRO, 2011b; HIBLER et al., 2010).

**Figura 7** - A interação entre a vitamina D e a célula alvo na glândula paratireoide. Após chegar à célula alvo, a 1,25-diidroxi-vitamina D se dissocia da proteína de ligação à vitamina D, é internalizada e interage com o receptor de vitamina D (VDR). O VDR forma heterodímeros com os receptores retinóides (RXR). A ligação da 1,25-diidroxi-vitamina D com o complexo VDR/RXR é seguida da ligação deste complexo com os elementos de resposta à vitamina D, os quais iniciam, então, a transcrição na região promotora dos seus genes alvo.

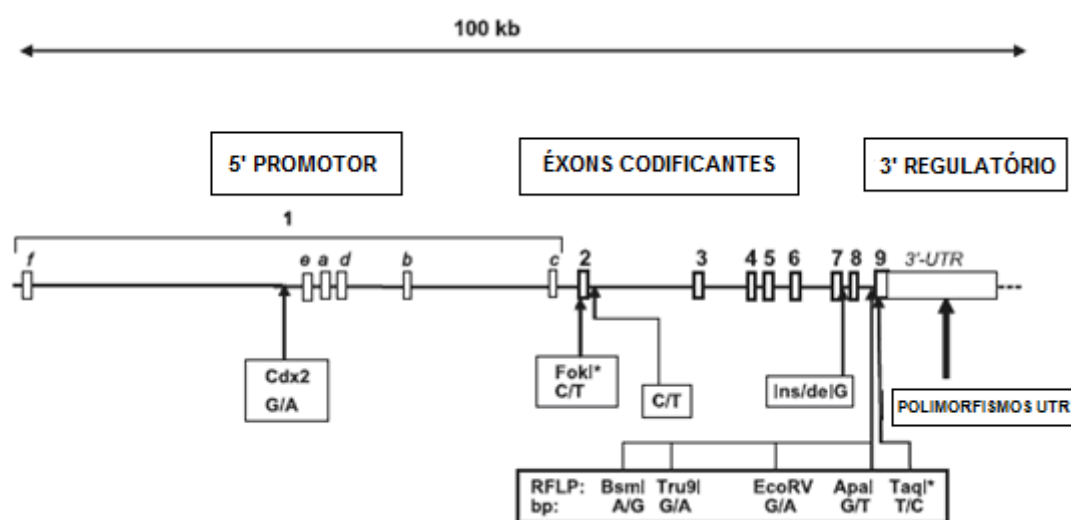


Fonte: LANDRY et al (2011)

As principais etapas envolvidas no controle da transcrição gênica incluem a ligação da 1,25(OH)<sub>2</sub>D à porção hidrofóbica do VDR induzindo uma mudança conformacional e formação do complexo transcricional hormônio-receptor. Esse complexo hormônio-receptor é heterodimerizado com os receptores retinóides (RXR) e esse heterodímero, acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, denominada VDRE (elementos de resposta à vitamina D), localizados nas regiões promotoras de genes que são ativados pela vitamina D. Em sequência à ligação ao DNA, há recrutamento de outras proteínas nucleares correpletórias que permitem a ligação entre o receptor e a maquinaria de transcrição, desencadeando a resposta biológica (CASTRO, 2011c; LANDRY et al., 2011).

O gene *VDR* está localizado no cromossomo 12, na posição 12q13.1. Possui mais de 100 kb, contendo oito éxons (2-9) e seis regiões de processamento alternativo (1A-1F) que estão localizadas em áreas funcionalmente relevantes, incluindo a região promotora (Figura 8) (BORÓN et al., 2014; HADDAD, 2014; VILARINO et al., 2011).

**Figura 8** - Gene *VDR*, demonstrando os íntrons e éxons e seus polimorfismos mais frequentemente estudados (*Cdx2*, *FokI*, *BsmI*, *TaqI* e *Apal*).



Fonte: Adaptado de UITTERLINDEN (2004)

O gene *VDR*, é altamente polimórfico, com mais de 60 polimorfismos descritos. Esses polimorfismos podem afetar a função do *VDR* e assim por consequência, a ação da Vitamina D3. Dois dos polimorfismos mais frequentemente estudados (*FokI* e *Cdx2*) tem sido associados à baixa densidade mineral óssea (DMO) e elevado risco de fratura óssea, denotando a importância da sinalização intacta calcitriol-*VDR* para a manutenção de normocalcemia (CASADO-DIAZ et al., 2013; DAMIANI et al., 2015; DE AZEVEDO E SILVA et al., 2013).

O polimorfismo *FokI* resulta da transição de uma citosina para uma timina (C-T) na junção do íntron 1 com o éxon 2 no códon de iniciação do *VDR*, que afeta a estrutura e a função da proteína codificada. Este polimorfismo pode



ser considerado um marcador genético independente, pois não parece estar em desequilíbrio de ligação com qualquer outro polimorfismo do gene *VDR* (COLOMBINI et al., 2014a; NEJENTSEV et al., 2004).

A presença do local de restrição *FokI*, definido como “f”, faz com que a proteína *VDR* seja produzida de forma completa (427 aminoácidos), enquanto que a ausência do local *FokI*, definido como “F”, inicia a tradução em outro local e sintetiza uma versão levemente truncada da proteína *VDR*, com três aminoácidos a menos (424 aminoácidos) (TANABE et al., 2015).

Um outro polimorfismo existente no gene *VDR*, que tem sido bem caracterizado, é o *Cdx2*. Yamamoto et al. (1999) descreveram um sítio de ligação para o fator de transcrição específico do intestino *Cdx-2* na região promotora do gene *VDR*. Posteriormente, Arai et al. (2001) identificaram o polimorfismo neste local, caracterizado pela transição de uma guanina por uma adenina. Essa variante parece ser funcional, pois influencia a expressão gênica do *VDR* no intestino (ARAI et al., 2001a; CHOI et al., 2013; KHAN et al., 2014a; YAMAMOTO et al., 1999).

Assim, a identificação de novos fatores de risco genético associados às repercussões clínicas na DF torna-se uma importante ferramenta para a determinação de marcadores prognósticos. Considerando que pacientes com doença falciforme apresentam muitas vezes quadros clínicos variados o que dificulta a tomada de decisões terapêuticas e de cuidados de saúde em geral, a identificação de padrões moleculares que influenciem na modulação fenotípica, poderia ser útil na estratificação de pacientes que necessitem de cuidados especiais.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar a existência da associação entre polimorfismos nos genes *BMP6* e *VDR* em pacientes com doença falciforme com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de osteonecrose.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Analisar as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com doenças falciformes, relacionando-as à manifestação clínica de interesse do estudo;
2. Identificar polimorfismos do gene *BMP6* e investigar sua associação com o desenvolvimento de osteonecrose em pacientes com doenças falciformes;
3. Analisar polimorfismos do gene *VDR* e investigar sua associação com o desenvolvimento de osteonecrose em pacientes com doenças falciformes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

A amostra foi constituída de 303 pacientes com doença falciforme, acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE (Recife – PE), que, de acordo com o desenvolvimento da osteonecrose, foram classificados em dois grupos:

- I) Grupo Caso: 105 (83 HbSS, 11 HbSC, 11 HbS $\beta$ ) pacientes que apresentam registro de ressonância magnética e/ou Raio-x que apresentam evidentes manifestações e queixas clínicas decorrentes de osteonecrose;
- II) Grupo Controle: 198 (114 HbSS, 51 HbSC, 33 HbS $\beta$ ) pacientes acima de 18 anos que não apresentam evidências sintomáticas de osteonecrose e nem de outra manifestação clínica da DF.

A cada convocação ou durante as visitas de rotina, cerca de 4 ml de sangue periférico foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante e conduzido para o laboratório de Hemoglobinopatias na Unidade de Laboratórios Especializados (UNILABE) do hospital HEMOPE e ao setor de Hematologia do Laboratório Central do Centro de Biociências (LABCEN/CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para a realização dos exames.

### 4.2 Desenho do estudo

Estudo do tipo corte transversal analítico retrospectivo, realizado no período de março/2015 a janeiro/2017. O trabalho foi desenvolvido na

Universidade Federal de Pernambuco, tendo a Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) como instituição coparticipante.

### **4.3 Aspectos éticos da pesquisa**

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE - N° do parecer: 1.792.544) (Anexo II). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os pacientes e/ou familiares, após informação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP (Anexo I).

### **4.4 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 (HbF) 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.

### **4.5 Análise molecular**

#### **4.5.1 Extração do DNA Genômico**

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

#### 4.5.2 Avaliação dos moduladores moleculares

A pesquisa da mutação  $\alpha^2$  3,7Kb foi investigada por *PCR* convencional, utilizando-se os iniciadores C2 e C10, onde os oligonucleotídeos iniciadores se ligam na região que compreende a possível deleção, gerando padrões distintos de produtos de amplificação, conforme previamente descrito (Dode *et al.* 1993).

Sumariamente, 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  $\mu$ l de DNA (250ng); 2,5  $\mu$ l de tampão  $\alpha$ ; 2,5  $\mu$ l de DMSO; 0,75 $\mu$ l de dNTP 10mM; 0,5  $\mu$ l de cada *primer* 10 $\mu$ M (Tabela 6); 0,25 $\mu$ l de taq polimerase 5U/ $\mu$ l, em um volume final de 25,0  $\mu$ 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 2** - Sequencia dos primers para pesquisa da deleção  $\alpha^{3,7Kb}$ . Localização referente ao gene  $\alpha$  no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID:J00153).

<i>Primers</i>	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	AS	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	S	5641

S = Sense; AS = Anti-sense.

#### 4.5.3 Análise dos polimorfismos dos genes *BMP6* e *VDR*

Foram selecionados para este estudo, seis SNPs localizados no gene do *BMP6* rs3812163 (A>T), rs270393 (C>T), rs1225934 (C>A), rs449853 (C>T), rs267196 (A>T), rs267201 (A>G) e dois SNPs localizados no gene *VDR* rs2228570 (FokI) e rs11568820 (Cdx2) que apresentam MAF (do inglês, *minor allele frequency*) superior a 10% para população africana (YRI) e caucasiana (CEU). A metodologia empregada para a realização das genotipagens foi a

técnica de PCR em tempo real através da detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) utilizando o sistema TaqMan®. Os SNPs foram selecionados de acordo com dados da literatura (BALDWIN et al., 2005; ULUG et al., 2008; CHAOUCH et al., 2013; DE AZEVEDO E SILVA et al., 2013; KHAN et al., 2014; COLOMBINI et al., 2014) e informações complementares, foram adquiridas em bancos de dados do estudo do genoma humano tais como: 1000 Genomas [<http://www.1000genomes.org>] e dbSNP Short Genetic Variations [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>].

Todos estes procedimentos foram realizados utilizando-se a infraestrutura do Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

#### **4.6 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. Para as diferenças entre as variáveis contínuas utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste Chi-quadrado e o teste exato de Fisher. E para a curva de sobrevida foi utilizado o teste Kaplan-meier. O nível de significância foi ajustado para 5%.

## 5 RESULTADOS

Após análise de 993 prontuários dos pacientes com DF (747 HbSS, 146 HbSC e 91 HbS $\beta$ ) atendidos no Hemope, 303 foram selecionados para a pesquisa. Destes 105 compõem o grupo caso (osteonecrose presente), sendo eles 83 HbSS, 11 HbSC, 11 HbS $\beta$ , e 198 pacientes que compuseram o grupo controle (osteonecrose ausente), sendo eles 114 HbSS, 51 HbSC e 33 HbS $\beta$ . Os resultados da caracterização clínico laboratorial dos pacientes AF (HbSS) estão expostos na tabela 3.

A osteonecrose esteve presente em 83 pacientes HbSS (11,1%), 11 pacientes HbSC (7,5%) e 11 pacientes HbS $\beta$  (12%). E mostrou diferença significativa entre os sexos apenas nos pacientes HbSS do grupo controle ( $P=0,001$ ), constituído majoritariamente por mulheres.

A mediana da idade de todos os pacientes foi de 31 anos (11 - 55 anos) para os pacientes HbSS; 35 anos (14 – 78) para os pacientes HbSC e de 30,5 anos (16 – 66) para os pacientes HbS $\beta$ . A mediana da idade para o desenvolvimento de osteonecrose foi de 35 anos (6 - 45 anos) para os HbSS; 36 anos (9 – 69 anos) para os HbSC e de 21 anos (14 – 39 anos) para os HbS $\beta$ .

Foi encontrado associação dos pacientes HbSS (caso/controle) com o número de crises vaso-oclusivas ao ano (CVO) ( $P<0,0001$ ) e com o valor de hemoglobina fetal (HbF) ( $P=0,028$ ). Quanto a co-herança com a talassemia alfa, não foram encontrados resultados de associação com osteonecrose ( $p=0,510$ ), onde 50 pacientes HbSS (25,5%), 7 pacientes HbS $\beta$  (17,5%) e 5 pacientes HbSC (8,9%) apresentaram a mutação (heterozigotos + homozigotos).

**Tabela 3** - Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com anemia falciforme (HbSS) de acordo com a ocorrência de osteonecrose.

Caracterização dos pacientes SS	Todos os pacientes (n =197)		Osteonecrose Presente (n =83)		Osteonecrose Ausente (n =114)		P-valor
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	
<b>Gênero</b>							0,001*
Feminino	113	57,4	36	43,3	77	67,5	
Masculino	84	42,6	47	56,7	37	32,5	
<b>Idade (anos), mediana</b>	31		31		31		
<b>Intervalo</b>	11 - 55		11 - 55		18 - 53		
<b>Alfa-tal (-<sup>3,7kb</sup>)</b>							0,510
Normal	146	74,5	59	71,9	87	76,3	
Mutado**	50	25,5	23	28,1	27	23,7	
<b>CVO</b>							<0,0001*
<3	94	47,9	20	24,4	74	64,9	
>3	86	43,8	49	59,7	37	32,4	
>6	16	8,3	13	15,9	3	2,7	
<b>Hemácias (x 10<sup>12</sup> células/μL), mediana</b>	2,5		2,6		2,6		0,764
<b>Intervalo</b>	1,2 - 4,8		1,50 - 4,8		1,29 - 4,6		
<b>Hb(g/dL), mediana</b>	8,0		8,2		8,0		0,534
<b>Intervalo</b>	4,2 - 13,3		5,1 - 13,3		4,2 - 11,5		
<b>Ht (%), mediana</b>	24,4		25,1		24,1		0,133
<b>Intervalo</b>	12,1 - 41		14,8 - 41,0		12,1 - 34,1		
<b>Hb F (%), mediana</b>	7,2		7,5		9,4		0,028*
<b>Intervalo</b>	0,8 - 28		0,8 - 27,1		1,0 - 28,0		
<b>Reticulócitos (%), mediana</b>	9,3		9,5		10,1		0,195
<b>Intervalo</b>	0,9 - 45,0		0,9 - 45,0		1,5 - 24,0		
<b>Leucócitos (x 10<sup>9</sup>/L), mediana</b>	11,1		11,7		12,3		0,080
<b>Intervalo</b>	1,6 - 71		1,6 - 71,0		5,3 - 25,9		
<b>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/L), mediana</b>	389,0		388,6		372,4		0,927
<b>Intervalo</b>	14,0 - 814,0		116,0 - 814,0		14,0 - 793,0		
<b>BI (mg/dL), mediana</b>	2,2		2,7		2,7		0,808
<b>Intervalo</b>	0,1 - 12		0,1 - 12,0		0,1 - 9,6		
<b>LDH (U/L), mediana</b>	765,0		972,0		829,3		0,283
<b>Intervalo</b>	192,0 - 3000,0		192,0 - 3000,0		223,0 - 2850,0		
<b>AST(U/mL), mediana</b>	41,0		47,6		42,4		0,280
<b>Intervalo</b>	13,0 - 151,0		16,0 - 151,0		13,0 - 105,0		
<b>F. Alc. (U/L), mediana</b>	135,3		151,3		125,4		0,075
<b>Intervalo</b>	43,0 - 489,0		59,0 - 445,0		43,0 - 489,0		

HbF, Hemoglobina fetal; AST, Aspartato aminotransferase; CVO, crises vaso-oclusivas; F. Alc, Fosfatase alcalina.

\*Diferença estatisticamente significativa (p<0.05).



As caracterizações clínico laboratoriais dos pacientes HbS $\beta$  e HbSC também foram realizadas; a associação dos pacientes HbS $\beta$  (caso/controle) foi obtida com o número de leucócitos ( $P=0,044$ ), plaquetas ( $P=0,035$ ) e reticulócitos ( $P=0,019$ ) (Tabela 4). Em relação aos pacientes HbSC foi encontrada associação com o número de hemácias (0,050) (Tabela 5).

**Tabela 4** - Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes S $\beta$  de acordo com a ocorrência de osteonecrose.

Caracterização dos pacientes S $\beta$	Todos os pacientes (n =44)		NACF Presente (n =11)		NACF Ausente (n =33)		P-valor
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	
<b>Gênero</b>							0,164
Feminino	25	56,8	4	36,4	21	63,6	
Masculino	19	43,2	7	63,6	12	36,4	
<b>Idade (anos), mediana</b>	30,5		31		30		
<b>Intervalo</b>	15 – 66		15 - 40		18 - 66		
<b>Alfa-tal (-<sup>3,7kb</sup>)</b>							0,650
Normal	33	82,5	10	90,9	23	79,3	
Mutado <sup>2</sup>	7	17,5	1	9,1	6	20,7	
<b>CVO</b>							0,338
<3	27	61,4	5	45,5	22	66,7	
>3	13	29,5	4	36,4	9	27,3	
>6	4	9,1	2	18,2	2	6,1	
<b>Hemácias (x 10<sup>12</sup> células/<math>\mu</math>L), mediana</b>	4,4		4,4		4,4		0,989
<b>Intervalo</b>	2,4 - 6,06		3,12 – 6,06		2,9 – 6,0		
<b>Hb(g/dL), mediana</b>	9,9		9,1		10,1		0,444
<b>Intervalo</b>	6,8 – 13,7		6,9 – 13,2		6,8 – 13,7		
<b>Ht (%), mediana</b>	31,9		30,4		32,3		0,786
<b>Intervalo</b>	22,6 – 45,5		24,4 – 41,7		22,6 – 45,5		
<b>Hb F (%), mediana</b>	4,5		7,5		3,9		0,331
<b>Intervalo</b>	0,2 – 26,1		0,3 – 17,8		0,2 – 26,1		
<b>Reticulócitos (%), mediana</b>	3,8		6,2		3,0		0,044*
<b>Intervalo</b>	0,3 - 25		1,4 – 22,5		0,3 – 25		
<b>Leucócitos (x 10<sup>9</sup>/L), mediana</b>	8,0		9,6		7,4		0,019*
<b>Intervalo</b>	2,1 – 22,2		6,7 - 13,6		2,1 – 22,2		
<b>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/L), mediana</b>	245		417		226		0,035*
<b>Intervalo</b>	98 - 631		156 - 493		98 – 631		
<b>BI (mg/dL), mediana</b>	1,1		1,1		1,0		0,989
<b>Intervalo</b>	0,05 – 6,41		0,2 – 2,96		0,05 – 6,41		
<b>LDH (U/L), mediana</b>	637		686		637		0,438
<b>Intervalo</b>	167 - 2109		492 - 978		167 - 2109		
<b>AST(U/mL), mediana</b>	31,5		35		26		0,689
<b>Intervalo</b>	10 - 130		11 - 48		10 - 130		
<b>F. Alc. (U/L), mediana</b>	129,5		173		113		0,193
<b>Intervalo</b>	40 - 372		69 - 372		40 - 286		

**Tabela 5** - Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes SC de acordo com a ocorrência de osteonecrose.

Caracterização dos pacientes SC	Todos os pacientes (n =62)		Osteonecrose Presente (n =11)		Osteonecrose Ausente (n =51)		P-valor
	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	
<b>Gênero</b>							0,087
Feminino	42	67,7	10	90,9	32	62,7	
Masculino	20	32,3	1	9,1	19	37,3	
<b>Idade (anos), mediana</b>	35		34		35		
<b>Intervalo</b>	14 - 78		14 - 74		18 - 78		
<b>Alfa-tal (-<sup>3,7kb</sup>)</b>							1,000
Normal	51	91,1	10	90,9	41	91,1	
Mutado**	5	8,9	1	9,1	4	8,9	
<b>CVO</b>							0,077
<3	40	64,5	4	36,4	36	70,5	
>3	20	32,2	6	54,5	14	27,4	
>6	2	3,3	1	9,1	1	2,1	
<b>Hemácias (x 10<sup>12</sup> células/<math>\mu</math>L), mediana</b>	4,1		4,0		4,2		0,050*
<b>Intervalo</b>	3,2 – 6,0		3,2 – 4,5		3,2 – 6,0		
<b>Hb(g/dL), mediana</b>	10,9		10,5		11,1		0,090
<b>Intervalo</b>	8,6 – 15,0		8,9 – 11,7		8,6 – 15,0		
<b>Ht (%), mediana</b>	33,5		32,4		33,8		0,208
<b>Intervalo</b>	27,1 – 47,2		27,1 – 36,5		27,6 – 47,2		
<b>Hb F (%), mediana</b>	1,6		1,3		1,6		0,819
<b>Intervalo</b>	0,2 – 11,3		0,4 – 11,3		0,2 – 5,9		
<b>Reticulócitos (%), mediana</b>	2,09		4,2		2,6		0,254
<b>Intervalo</b>	0,2 – 12,5		2,2 – 6,7		0,2 – 12,5		
<b>Leucócitos (x 10<sup>9</sup>/L), mediana</b>	9,4		9,2		9,5		0,741
<b>Intervalo</b>	3,8 – 18,9		6,9 – 12,3		3,8 – 18,9		
<b>Plaquetas (x 10<sup>9</sup>/L), mediana</b>	223,0		321,0		221,5		0,083
<b>Intervalo</b>	97,0 – 647,0		171,0 – 647,0		97,0 – 573,0		
<b>BI (mg/dL), mediana</b>	1,0		0,9		1,0		0,646
<b>Intervalo</b>	0,1 – 4,4		0,5 – 2,1		0,1 – 4,4		
<b>LDH (U/L), mediana</b>	521,0		452,0		529,0		0,671
<b>Intervalo</b>	209,0 – 929,0		278,0 – 929,0		209,0 – 903,0		
<b>AST(U/mL), mediana</b>	25,0		23,0		26,0		0,544
<b>Intervalo</b>	11,0 – 60,0		15,0 – 39,0		11,0 – 60,0		
<b>F. Alc. (U/L), mediana</b>	85,0		78,0		87,0		0,236
<b>Intervalo</b>	21,0 – 439,0		52,0 – 83,0		21,0 – 439,0		

HbF, Hemoglobina fetal; AST, Aspartato aminotransferase; CVO, crises vaso-oclusivas; F. Alc, Fosfatase alcalina.

\*Diferença estatisticamente significativa (p<0.05).

\*\* Heterozigoto e homozigoto.

Para os estudos de associação genética, foram empregados modelos de análise estatística dominante, codominante e recessivo. Na tabela 6 estão apresentados os principais resultados encontrados no modelo codominante por melhor representar os dados obtidos nos pacientes HbSS (homozigoto variante *versus* homozigoto selvagem *versus* heterozigoto).

**Tabela 6** - Frequencia observada dos SNPs dos genes *BMP6* e *VDR* para os pacientes HbSS.

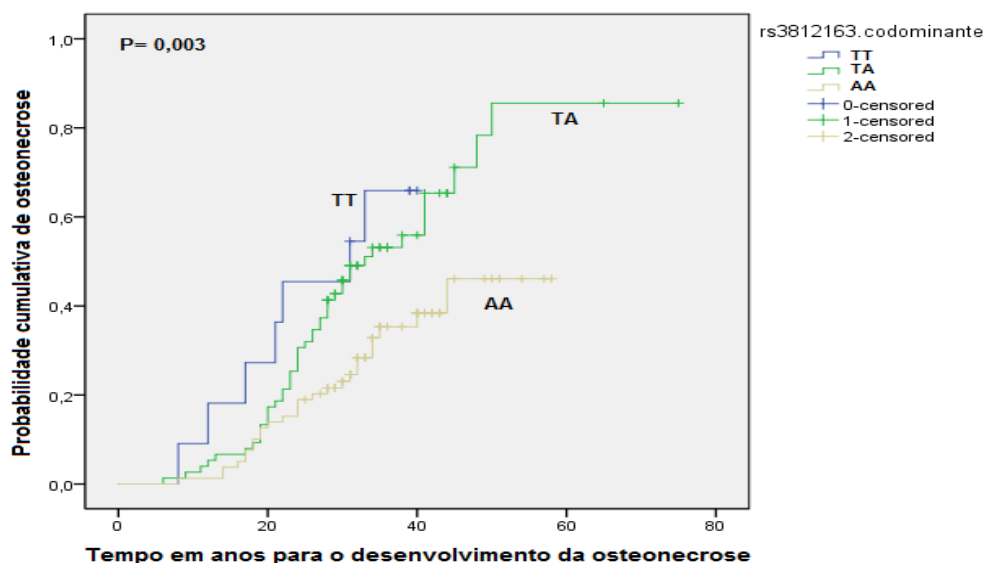
		<b>Casos (83)</b>	<b>Controles (114)</b>	<b>p-valor</b>
		<b>N(%)</b>	<b>N(%)</b>	
<b><i>BMP6</i> rs3812163</b>	<b>TT</b>	7 (8,4)	5 (4,4)	<0,0001*
<b>(T&gt;A)</b>	<b>TA</b>	48 (57,8)	38 (33,3)	
	<b>AA</b>	28 (33,8)	71 (62,3)	
<b><i>BMP6</i> rs1225934</b>	<b>CC</b>	73 (87,9)	98 (86,0)	0,772
<b>(C&gt;A)</b>	<b>CA</b>	9 (10,8)	13 (11,4)	
	<b>AA</b>	1 (1,3)	3 (2,6)	
<b><i>BMP6</i> rs270393</b>	<b>CC</b>	24 (28,9)	25 (21,9)	0,280
<b>(C&gt;G)</b>	<b>CG</b>	43 (51,8)	72 (63,1)	
	<b>GG</b>	16 (19,3)	17 (15,0)	
<b><i>BMP6</i> rs449853</b>	<b>TT</b>	22 (26,5)	32 (28,1)	0,857
<b>(T&gt;C)</b>	<b>TC</b>	40 (48,2)	57 (50,0)	
	<b>CC</b>	21 (25,3)	25 (21,9)	
<b><i>BMP6</i> rs267196</b>	<b>TT</b>	26 (31,3)	49 (42,9)	0,113
<b>(T&gt;A)</b>	<b>TA</b>	51 (61,4)	62 (54,4)	
	<b>AA</b>	6 (7,3)	3 (2,7)	
<b><i>BMP6</i> rs267201</b>	<b>AA</b>	25 (30,1)	15 (13,1)	0,0001*
<b>(A&gt;G)</b>	<b>AG</b>	44 (53,0)	93 (81,6)	
	<b>GG</b>	14 (16,9)	6 (5,3)	
<b><i>VDR</i> rs2228570</b>	<b>CC</b>	39 (47,0)	59 (51,7)	0,024*
<b>(C&gt;T)</b>	<b>CT</b>	42 (50,6)	42 (36,8)	

	<b>TT</b>	2 (2,4)	13 (11,5)	
<b>VDR rs11568820</b>	<b>GG</b>	19 (22,9)	23 (20,2)	0,046*
<b>(G&gt;A)</b>	<b>GA</b>	40 (48,2)	73 (64,0)	
	<b>AA</b>	24 (28,9)	18 (15,8)	

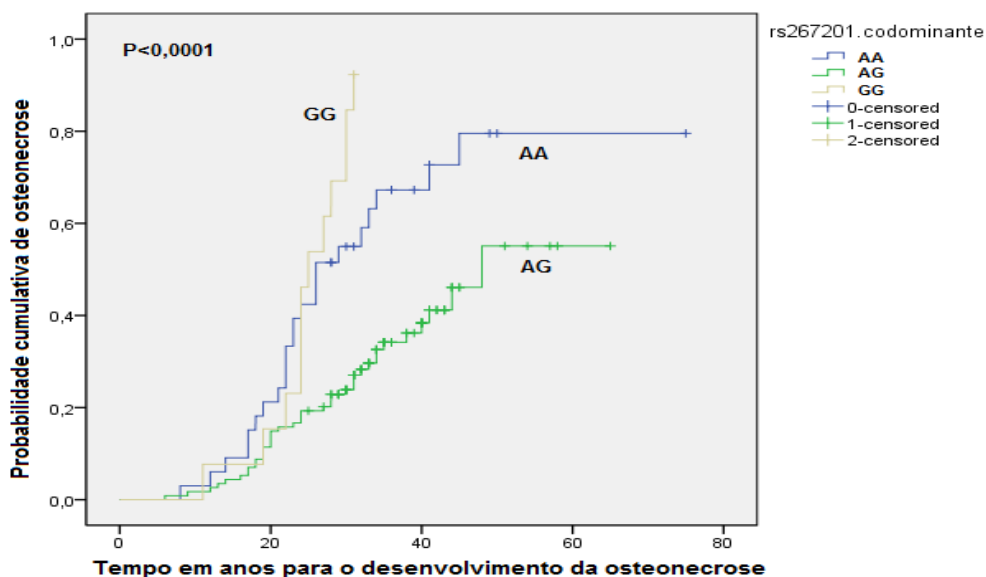
Em relação ao gene *BMP6* apenas os rs3812163 (T>A) e rs267201 (A>G) mostraram-se associados ao desenvolvimento de osteonecrose ( $P<0,0001$ ), demonstrando o genótipo homozigoto recessivo (AA) (rs3812163) e o genótipo heterozigoto (AG) (rs267201) como fatores protetores contra o desenvolvimento da osteonecrose.

Avaliando o risco cumulativo para o desenvolvimento da osteonecrose, observamos que os pacientes com genótipo TT e TA apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento de osteonecrose que os AA (rs3812163) ( $P= 0,003$ ) (figura 9). Em relação ao risco cumulativo do rs267201 observamos que os pacientes com genótipo AG apresentaram uma menor taxa de desenvolvimento de osteonecrose que os AA e GG ( $P<0,0001$ ) (figura 10). Não foi possível encontrar resultados estatisticamente significativos para os demais SNPs do gene *BMP6* estudados.

**Figura 9** - Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *BMP6* (rs3812163).



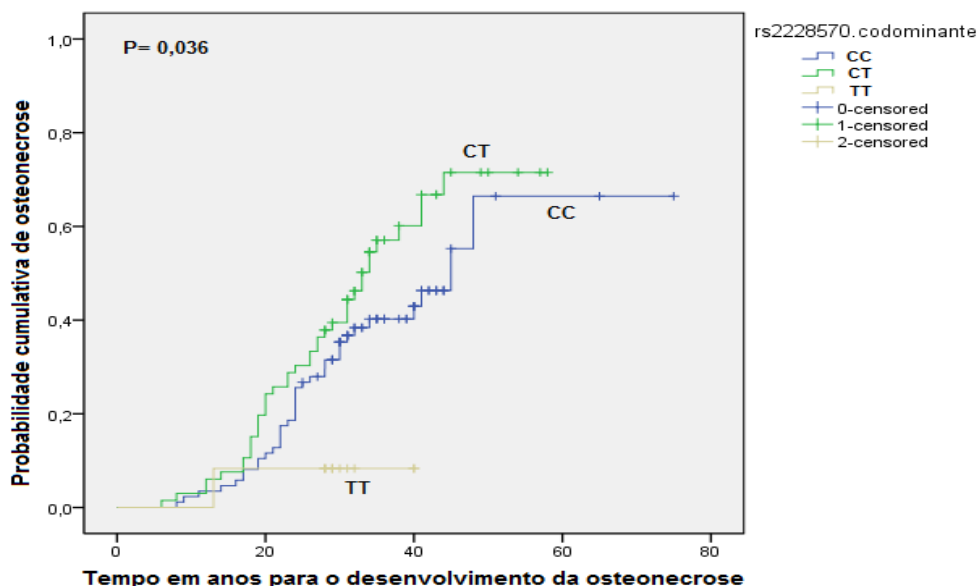
**Figura 10** - Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *BMP6* (rs267201).



No caso dos polimorfismos no gene do *VDR*, obtivemos resultados estatisticamente significativos para ambos os polimorfismos. Em relação ao rs2228570 (FokI) o genótipo homocigoto recessivo (TT) aparece como um fator protetor contra o desenvolvimento da osteonecrose ( $P= 0,024$ ). Avaliando o risco cumulativo para o desenvolvimento da osteonecrose, observamos que os

pacientes com genótipo CC e CT apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento de osteonecrose que os TT ( $P= 0,036$ ) (figura 11).

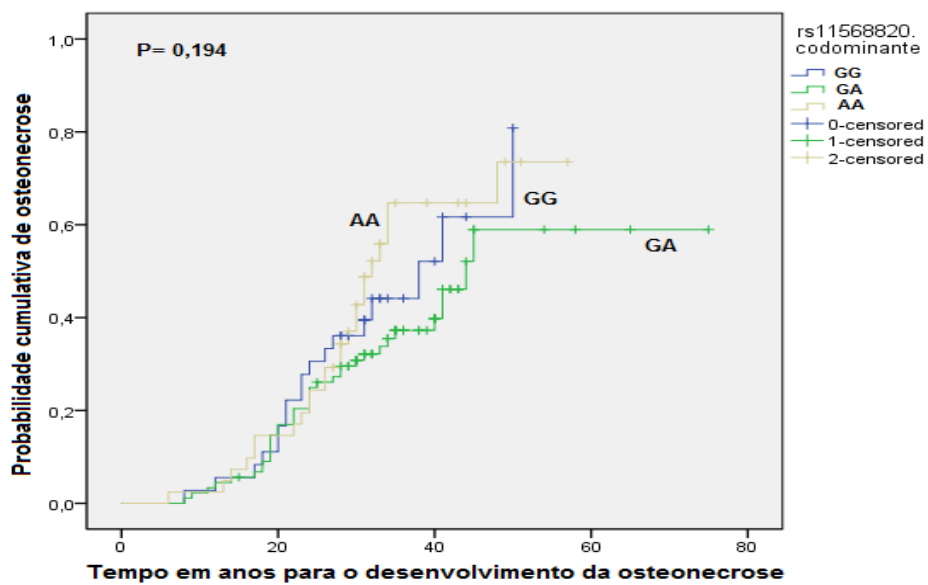
**Figura 11** - Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *VDR* (rs2228570).



O rs11568820 (*Cdx2*) também aparece como um fator protetor para o desenvolvimento da osteonecrose em seu genótipo heterozigoto (GA) ( $P= 0,046$ ). Avaliando o risco cumulativo para o desenvolvimento da osteonecrose, não observamos diferenças significativas entre os genótipos ( $P= 0,194$ ). (Figura 12).

Também foram realizadas as análises desses polimorfismos estatisticamente significantes para nossa população de pacientes HbSC e HbS $\beta$ , porém nenhum resultado estatístico foi encontrado (Anexo III).

**Figura 12** - Probabilidade cumulativa para o desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *VDR* (rs11568820).





## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, apresentamos o perfil clínico-laboratorial de pacientes com doença falciforme que desenvolveram osteonecrose, que foram atendidos no HEMOPE, no estado de Pernambuco. A partir da caracterização dos indivíduos, foi possível investigar a associação de polimorfismos nos genes *BMP6* e *VDR* que possivelmente estão envolvidos na fisiopatologia da osteonecrose.

A osteonecrose esteve presente em 11,1% dos pacientes HbSS, 7,5% HbSC e 12% dos pacientes HbS $\beta$ . A mediana de idade desses pacientes foi de 31, 35 e 30,5 anos respectivamente. A evolução das doenças falciformes é marcada por uma diversidade fenotípica de complicações clínicas, que atingem a maioria dos órgãos e sistemas. Algumas dessas complicações não reduzem a expectativa de vida do paciente, porém podem comprometer consideravelmente a sua qualidade de vida. Estudos anteriores sugerem que a frequência de osteonecrose na população falciforme é de 10 a 30%, e por volta dos 35 anos, metade dos pacientes com anemia falciforme apresentarão sinais e sintomas clínicos de osteonecrose (BALDWIN et al., 2005e; DALTRO et al., 2008b; MILNER et al., 1991).

Powars et al (2002), num estudo realizado nos Estados Unidos, relataram que complicações órgão-específicas crônicas ocorreram em 112 indivíduos (39%) de um total de 284 pacientes HbSC. Os autores não observaram complicações como síndrome de mão-pé (dactilite infantil) nem AVC, apenas raros episódios de osteonecrose durante a primeira década de vida desses pacientes. Na segunda década de vida, observou-se um aumento da incidência dessas manifestações clínicas, sendo as mais frequentes a

retinopatia avançada em 65 indivíduos (23%) e osteonecrose (necrose avascular) em 42 indivíduos (15%) (POWARS et al., 2002a).

Comumente, a osteonecrose apresenta um diagnóstico tardio, quando os pacientes já apresentam limitação na locomoção, restando apenas, como tratamento, a analgesia paliativa ou uma intervenção cirúrgica (AKINYoola et al., 2008d; MARSH et al., 2015b).

No nosso estudo a mediana de desenvolvimento de osteonecrose dos pacientes SS, SC e S $\beta$  foram 35, 36 e 21 anos respectivamente. E observamos uma diferença significativa entre os sexos apenas nos pacientes HbSS do grupo controle (P=0,001), constituído majoritariamente por mulheres. Powars et al (2002) relacionaram a maior frequência observada de osteonecrose e retinopatia a partir da segunda década de vida dos pacientes, com uma melhor capacidade de diagnóstico por imagem, utilizando técnicas mais modernas de ressonância magnética, de documentar anormalidades mais precocemente durante o curso da doença (POWARS et al., 2002b).

Além disso, também foi relatado que a osteonecrose afeta primariamente os adultos jovens, entre 20 e 50 anos. Em geral, os pacientes têm menos de 40 anos na época do diagnóstico e a manifestação é mais comum entre o sexo masculino (BORJAILLE et al., 2006; LONERGAN et al., 2001). Assim, é evidente a necessidade de uma identificação precoce da manifestação. Quanto mais cedo o diagnóstico for realizado, e tomadas todas as medidas cabíveis tais como: acompanhamento por serviços especializados, com avaliações periódicas (CANÇADO & JESUS, 2007c).

Em relação aos moduladores moleculares clássicos, nas nossas análises não encontramos relação da co-herança da alfa talassemia com o desenvolvimento da osteonecrose. Dados controversos são encontrados em diferentes estudos envolvendo pacientes com a doença falciforme, que

associam a alfa talassemia como sendo um importante fator de risco às complicações vaso-oclusivas da doença falciforme (ADEKILE et al., 2001b; BALLAS et al., 1989b; SILVA FILHO et al., 2011; STEINBERG et al., 1995; PANDEY et al., 2011).

Encontramos associação dos pacientes HbSS (caso/controle) com frequentes crises vaso-oclusivas ao ano (CVO) ( $P < 0,0001$ ), onde observamos uma alta frequência de mais de 6 CVO/ano nos pacientes caso (15,3%) quando comparados aos controles (2,7%); e com os níveis de HbF ( $P = 0,028$ ) que estão mais elevados nos pacientes do grupo controle (9,4) em relação ao grupo caso (7,5).

Estudos relataram que a talassemia alfa, idade, hematócrito elevado, trombofilia, e frequentes eventos vaso oclusivos são fatores de risco para o desenvolvimento da osteonecrose por aumentar a viscosidade sanguínea (ADEKILE et al., 2001c; AKINYOOOLA et al., 2009e; BALLAS et al., 1989c). Já os níveis mais elevados de HbF foram associados com uma taxa reduzida de episódios dolorosos agudos, úlceras na perna, osteonecrose, síndromes torácicas agudas e redução da gravidade da doença, por diminuir a taxa de polimerização da hemoglobina (AKINSHEYE et al., 2011; LETTRE et al., 2008b).

Em relação à caracterização clínico laboratorial dos pacientes HbS $\beta$ , foi encontrado a associação dos pacientes com HbS $\beta$  caso com o número elevado de leucócitos ( $P = 0,019$ ), plaquetas ( $P = 0,035$ ) e reticulócitos ( $P = 0,044$ ). Um dos fenômenos mais importantes para o desenvolvimento da osteonecrose é a vaso-oclusão e tal evento resulta de um cenário complexo que envolve interações entre eritrócitos falcizados e outros componentes presentes no sangue (células endoteliais, leucócitos, plaquetas e reticulócitos), levando ao aprisionamento dos eritrócitos mais densos, senescentes e disformes

resultando numa redução do fluxo sanguíneo (KAUL et al., 2009b; MANWANI & FRENETTE, 2013c).

No presente estudo, investigamos seis polimorfismos no gene do *BMP6* rs3812163 (A>T), rs270393 (C>T), rs1225934 (C>A), rs449853 (C>T), rs267196 (A>T), rs267201 (A>G). Porém apenas os polimorfismos *BMP6* rs3812163 (A>T) e rs267201 (A>G) que estão localizados *upstream* do gene e intronicamente, respectivamente, se mostraram associados no seu genótipo homocigoto variante (AA) e (AG) como fatores de proteção ( $P < 0,0001$ ) para o desenvolvimento da osteonecrose.

Nosso estudo é o primeiro do Brasil a associar polimorfismos no *BMP6* ao aumento na frequência de osteonecrose em pacientes com DF. Baldwin et al. (2005), identificaram associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) no gene *BMP6* distribuídos ao longo do gene (em regiões intrônicas e intergênicas) (rs270393, rs267196, rs267201, rs449853, rs1225934), com o desenvolvimento de osteonecrose em uma coorte de 442 pacientes AF da América do Norte (BALDWIN et al., 2005f).

Resultados semelhantes foram relatados por Ulug et al (2008) que também relacionaram o polimorfismo no *BMP6* (rs3812163) como um fator protetor para os pacientes com doença falciforme, numa população de 244 indivíduos em Londres; e por Chaouch et al (2013) que também observaram associação dos polimorfismos no gene do *BMP6* (rs 267196 e rs267201) a um aumento na susceptibilidade da ocorrência de osteonecrose em relação a pacientes AF sem esta manifestação, com uma associação significativa entre os alelos A do rs267196 e G do rs267201 e a osteonecrose ( $P = 0,0023$ ) (CHAOUCH et al., 2013c; ULUG et al., 2008d). Estes autores propõem que estes polimorfismos possam atuar na mineralização e reabsorção óssea, e que

juntos, acarretariam aos indivíduos afetados, um microambiente ósseo protegido, contra o desenvolvimento da osteonecrose.

As proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) têm diversas funções durante o desenvolvimento e a organogênese. Desempenham um papel importante no desenvolvimento do esqueleto e na formação óssea, e perturbações na sua sinalização podem causar uma variedade de anomalias esqueléticas e extraesqueléticas. (BEEDERMAN et al., 2013a).

Estudos têm demonstrado a capacidade das BMPs de induzir as células tronco mesenquimais para se diferenciarem em osso, confirmando o seu papel na formação óssea e da cartilagem (BEEDERMAN et al., 2013b; VUKICEVIC & GRGUREVIC, 2009b). BMPs também desempenham um papel importante na manutenção da homeostase, tais como a manutenção da integridade da articulação, o início da reparação de fraturas, e a remodelação vascular. Além de participar de processos essenciais para o desenvolvimento, tais como a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose (VUKICEVIC & GRGUREVIC, 2009c; WANG et al., 2014d).

Devido à sua importância como regulador em todo o corpo, diversas pesquisas com polimorfismos no gene do *BMP6* também foram realizadas com a finalidade de encontrar possíveis marcadores moleculares que estariam envolvidos em várias patologias como o câncer, espondilite anquilosante e hipertensão pulmonar (ASHLEY-KOCH et al., 2008; JOO et al., 2014; WANG et al., 2014e).

Diante da importância do papel do BMP6 no metabolismo ósseo, é necessário um maior entendimento do balanço da expressão gênica dos reguladores da via principalmente nos pacientes com doença falciforme, uma vez que o processo de desenvolvimento da necrose é agravado não apenas pelo quadro clínico dos pacientes, mas também por fatores ambientais e

socioeconômicos que envolvem a doença (BELISÁRIO et al., 2010c, WANG et al., 2014f).

Em relação ao gene *VDR* obtivemos resultados estatisticamente significativos para ambos os polimorfismos. Nosso estudo também é o primeiro a associar polimorfismos do *VDR* ao aumento na frequência de osteonecrose em pacientes com DF. Para o rs2228570 (FokI) o genótipo homocigoto variante recessivo (TT) aparece como um fator protetor contra o desenvolvimento da osteonecrose (P= 0,024). Avaliando o risco cumulativo para o desenvolvimento da osteonecrose, observamos que os pacientes com genótipo CC e CT apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento de osteonecrose que os TT (rs2228570) (P= 0,036).

Relling et al (2004) e Colombini et al (2014) encontraram uma relação do genótipo CC (rs2228570) com um risco aumentado de osteonecrose em crianças com câncer (P=0,05) e para o desenvolvimento de discopatias e osteocondrose (P=0,012) respectivamente. Colombini ainda indicou o genótipo TT como protetor contra discopatias e osteocondrose em pacientes com patologias na coluna cervical (P=0,042) (COLOMBINI et al., 2014b; RELLING et al., 2004).

Além disso, nos estudos de Abrams et al (2005) e de Smolders et al (2009) foi visto que pacientes de genótipo CC para este polimorfismo possuíam concentrações significativamente menores de vitamina D do que os pacientes TT (ABRAMS et al., 2005; SMOLDERS et al., 2009). Desta forma, acreditamos que este polimorfismo pode atuar conduzindo a uma estrutura óssea mais saudável, que acarretariam aos indivíduos com genótipo TT, uma proteção contra o desenvolvimento de osteonecrose.

O rs11568820 (Cdx2) também aparece como um fator protetor para o desenvolvimento da osteonecrose em seu genótipo heterocigoto (GA) (P=

0,046). Avaliando o risco cumulativo para o desenvolvimento da osteonecrose, não observamos diferenças significativas entre os genótipos ( $P= 0,194$ ). Esse polimorfismo parece ser funcional, pois influencia a expressão gênica do *VDR* no intestino, de modo que a variação *Cdx-A* possui maior afinidade com a proteína *Cdx-2*, o que leva conseqüentemente um aumento da densidade mineral óssea (DMO) por meio de uma melhor absorção intestinal do cálcio (KHAN et al., 2014b).

A primeira pesquisa conhecida sobre o polimorfismo *Cdx-2* foi realizada com 261 mulheres japonesas nos períodos pré e pós-menopausa. De acordo com os resultados, o polimorfismo *Cdx-2* apresentou-se significativamente relacionado à DMO lombar em mulheres pós-menopausa. Fang *et al.* (2003) verificaram que indivíduos com o alelo *Cdx-A*, apresentavam menos fraturas lombares, sendo o efeito similar para ambos os sexos. Além disso, polimorfismo *Cdx-2* também se mostra alterado nas diferentes etnias, em pacientes com ancestralidade declarada. O alelo *Cdx-A* é mais freqüente nos negros (74%), seguido pelos asiáticos (43%) e menos freqüente nos brancos (19%) (ARAI et al., 2001b; FANG et al., 2003).

Embora os polimorfismos avaliados neste estudo tenham um possível potencial nos processos de surgimento de osteonecrose, a avaliação funcional dos níveis de transcritos e das proteínas codificadas da via do *BMP6* e do *VDR* também são importantes para entendermos o real impacto dessas variantes na modulação dos fenótipos apresentados por pacientes DF com osteonecrose.

Compreender os fatores de risco genéticos para o desenvolvimento da osteonecrose pode fornecer novos conhecimentos sobre a patogênese desta doença e, eventualmente, oferecer oportunidades para o seu tratamento, que atualmente é limitado.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Os polimorfismos *BMP6* rs3812163 (A>T) e rs267201 (A>G) se mostraram, em seu genótipo homozigoto variante e heterozigoto, respectivamente, como fatores de proteção contra a ocorrência de osteonecrose na amostra populacional estudada;
- Os polimorfismos *VDR* rs2228570 (C>T) e rs11568820 (G>A) se mostraram, em seu genótipo homozigoto variante e heterozigoto, respectivamente, como fatores de proteção contra a ocorrência de osteonecrose na amostra populacional estudada.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhishek K., Kumar R., Arif E., Patra P.K., Choudhary S.B., Sohail M. Induced expression of bone morphogenetic protein-6 and Smads signaling in human monocytes derived dendritic cells during sickle-cell pathology with orthopedic complications. **Biochem Biophys Res Commun**, v.396, n.4, 2010, p. 950-955.
- Abrams, S.A., Griffin I.J., Hawthorne K.M., Chen Z., Gunn S.K., Wilde M., Darlington G., Shypailo R.J., Ellis K.J. Vitamin D receptor Fok1 polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty. **J Bone Miner Res.**, v.20, 2005, p. 945–953.
- Adekile A.D., Gupta R., Yacoub F., Sinan T., Al-Bloushi M., Haider M.Z. Avascular necrosis of the hip in children with sickle cell disease and high Hb F: magnetic resonance imaging findings and influence of alpha-thalassemia trait. **Acta Haematol**, V.105, 2001, p.27-31.
- Akinsheye, I., Alsultan A., Solovieff N., et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v.118, 2011, p.19-27.
- Akinyoola, A.L., Adediran I.A., Asaley C.M., Bolarinwa AR. Risk Factors for osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. **In Orthop**. V.33, 2008, p. 923-926.
- Almeida, A & Roberts I. Bone involvement in sickle cell disease. **Br J Haematol**,v.129, 2005, p. 482-90.
- Alsultan, A., M. K. Alabdulaali, P. J. Griffin, A. M. Alsuliman, H. A. Ghabbour *et al*. Sickle cell disease in Saudi Arabia: the phenotype in adults with the Arab-Indian haplotype is not benign. **Br.J.Haematol**, v.164, 2014, p. 597-604.
- Arai, H., Miyamoto K., Yoshida M., Yamamoto H., Taketani Y., Morita K., Kubota M., Yoshida S., Ikeda M., Watabe F., Kanemasa Y., Takeda E. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. **Journal of Bone and Mineral Research.**, v.16, n. 7, 2001, p.1256-1264.
- Arlet, J.B., Courbebaisse M., Chatellier G., Eladari D., Souberbielle J.C., Friedlander G., de Montalembert M. Prié D., Pouchot J., Ribeil J.A. Relationship between vitamin D deficiency and bone fragility in sickle cell disease: a cohort study of 56 adults. **Bone**, v.52, 2013, p. 206-217.
- Ashley-Koch, A.E., Elliott L., Kail M.E., De Castro L.M., Jonassaint J., et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, 2008, p. 5721–5726.
- Baldwin, C.V.G., Nolan D.F., Wyszynski Q.L., Ma, P. Sebastiani *et al*. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood**, v. 106, 2005, p. 372-375.
- Ballas, S.K., Talacki C.A., Rao V.M., Steiner R.M. The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with  $\alpha$ -thalassemia. **Hemoglobin**, v. 13, 1989, p. 649–655.
- Belisário, A.R., Viana M.B.. Efeitos da talassemia alfa nas manifestações clínicas hematológicas da anemia falciforme: uma revisão sistemática. **Rev Med Minas Gerais**, v.20, 2010, p. 312-333.
- Bikle, D.D., Oda, Y., Tu, C.L., Jiang, Y. Novel mechanisms for the vitamin D receptor (VDR) in the skin and in skin cancer. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.148, 2014, p. 47–51.
- Bobacz, K., Gruber R., Soleiman A., Erlacher L., Smolen J.S., Graninger W.B. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. **Arthritis Rheum**, v. 48, 2003, p. 2501– 2508.
- Boroń, D., Kamiński, A., Kotrych, D., Bogacz, A., Uzar, I., Mrozkiewicz, P.M., Czerny, B. Polymorphism of vitamin D3 receptor and its relation to mineral bone density in perimenopausal women. **Osteoporos Int**, v.19, 2014.
- Cajado, C., Cerqueira B.A., Couto F.D., Moura-Neto J.P., Vilas-Boas W. 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**, v. 56, 2011, p. 312-317.
- Cançado, R.D., Jesus, J.A.. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol Hemoter**, v. 29, 2007, p. 203-206.
- Casado-Díaz, A., Cuenca-Acevedoa, R., Navarro-Valverdea, C., Díaz-Molinaa, C., Caballero-Villarraso, J., Santiago-Moraa,R., Doradob, G., Quesada-Gómez, J.M. Vitamin D status and the Cdx-2 polymorphism of the vitamin D receptor gene are determining factors of bone mineral density in young healthy postmenopausal women. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 136, 2013, p. 187– 189.
- Castro, L.C.G. The vitamin D endocrine system. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, 2011, p.55-63.

- Chaouch, L., Kalai M., Jbara M.B., Chaabene A.B., Darragi I. Association between rs267196 and rs267201 of BMP6 gene and osteonecrosis among sickle cell anemia patients. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 159, 2013, p. 145-149.
- Choi, S.K. Park, M.S., Song, J.K. Yoon, K.S., Yoon, K.L., Shim, K.S. Association of Polymorphisms in the Vitamin D Receptor Promoter with Idiopathic Short Stature. **J Korean Med Sci.**, v. 28, 2013, p. 1329-1333.
- Colella, M.P., de Paula E.V., Machado-Neto J.A., Conran N., Annichino-Bizzacchi J.M. Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. **Haematologica**, v. 100, 2015, p. 466-471.
- Colombini, A., Brayda-Bruno M., Lombardi G., Croiset S.J., Vrech V. FokI Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene (VDR) and Its Association with Lumbar Spine Pathologies in the Italian Population: A Case-Control Study. **PLoS ONE**, v. 9, 2014.
- Conran, N., Franco-Penteado C.F., Costa F.F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, 2009, p. 1-16.
- Daltro, G.C, Guedes A. Osteonecrose da cabeça femoral em crianças portadoras de anemia falciforme. **Revista Baiana de Pediatria**, v. 5, 2011, p. 19-24.
- Damiani, F.M., Martin R.M., Latronico A.C., Ferraz-de-Souza B. Normal bone mass and normocalcemia in adulthood despite homozygous vitamin D receptor mutations. **Osteoporos Int.**, v.26, 2015, p. 1819-1823.
- De, F.L., Cappellini, M.D., Olivieri, O. Thrombosis and sickle cell disease. **Semin.Thromb.Hemost.**, v.37, 2011, p. 226-236.
- De Azevêdo Silva, J., Monteiro Fernandes K., Três Pancotto J.A., Sotero Fragoso T., Donadi E.A., Crovella S., Sandrin-Garcia P. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus clinical manifestations. **Lupus**, 2013.
- Dode, C., Krishnamoorthy, R., Lamb, J., Rochette, J. Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. **Br.J.Haematol.**, v. 83, 1993, p. 105-111.
- Domingos, I. F., D. A. Falcao, B. L. Hatzlhofer, A. F. Cunha, M. N. Santos *et al.* Influence of the betas haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann.Hematol.**, v. 93, 2014, p. 1123-1129.
- Driss, A., Asare, K.O., Hibbert, J.M., Gee, B.E., Adamkiewicz T.V. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, 2009, p. 23-48.
- Fang, Y., Van Meurs J.B.J., Bergink A., Hofman A., Van Duijn C.M., Van Leeuwen J.P.T.M., Pols H.A.P., Utterlinden A.G. Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.18 n. 9, 2003, p. 1632-1641.
- Fertrin, K.Y., Costa F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev. Hematol.**, v. 3, 2010, p. 443-458.
- Ficat, R.P. Idiopathic bone necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment. **J Bone Joint Surg.**, v. 67, 1985, p. 3-9.
- Haddad, S. Vitamin-D receptor (VDR) gene polymorphisms (Taq-I & Apa-I) in Syrian healthy population. **Meta Gene.**, 2014, p. 646-650.
- Hassan, S.M., Al, M.M., Al, R.M., Bakker, E., Hartevelde, C.L. Sickle cell anemia and alpha-thalassemia: a modulating factor in homozygous HbS/S patients in Oman. **Eur.J.Med.Genet.**, v. 57, 2014, p. 603-606.
- Hibler, E.A. Association between polymorphic variation in VDR and RXRA and circulating levels of vitamin D metabolites. **J Steroid Bioch Mol Biol.** 2010, p. 438-441.
- Higgs, D.R. The molecular basis of alpha-thalassemia. **Cold Spring Harb.Perspect.Med.**, 2013.
- Huotaria, and Herzig K.H. Vitamin D and living in northern latitudes--an endemic risk area for vitamin D deficiency. **Int J Circumpolar Health.** 2008, p. 164-78.
- Inda Filho, A.J., Melamed M.L. Vitamin D and kidney disease: what we know and what we do not know. **J Bras Nefrol.**, 2013, p. 323-331.
- Joo, Y.B., Bang S.Y., Kim T.H., Shim S.C., Lee S., Joo K.B., Kim J.H., Min H.J., Rahman P., Inman R.D. Bone morphogenetic protein 6 polymorphisms are associated with radiographic progression in ankylosing spondylitis. **PLoS One.**, v.9, 2014.
- Jurutka, P.W., Remus L.S., Whitfield G.K., Thompson P.D., Hsieh J.C., Zitzer H., Tavakkoli P., Galligan M.A., Dang H.T., Haussler C.A., Haussler M.R. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. **Molecular Endocrinology.**, v.14, n. 3, 2000, p. 401-420.
- Kato, G.J., M.T. Gladwin, M.H. Steinberg. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**, v. 21, 2007, p. 37-47.

- Kaul, D.K.; Finnegan, E., Barabino, G.A. Sickle red cell-endothelium interactions. **Microcirculation**, v. 16, 2009, p. 97-111.
- Kayabasi, G.K., Aydin, R.S., Gumusderelioglu, M. In vitro chondrogenesis by BMP6 gene therapy. **J Biomed Mater Res.**, v. 101, 2013, p. 1353-1361.
- Khan, M.I., Bielecka, Z.F., Najm, M.Z., Bartnik, E., Czarnecki, J.S., Czarnecka, A.M., Szczylik, C. Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: current state and future approaches (review). **Int J Oncol.**, 2014, p. 349-63.
- Laaksonen, M.M., Karkkainen, M.U., Outila, T.A., Rita, H.J., Lamberg-Allardt, C.J. Vitamin D receptor gene start codon polymorphism (FokI) is associated with forearm bone mineral density and calcaneal ultrasound in Finnish adolescent boys but not in girls. **Journal of Bone Mineral Metabolism**, v. 22, n. 5, 2004, p. 479-485.
- Lanaro, C., Franco-Penteado, C.F., Albuquerque, D.M., Saad, S.T., Conran, N., *et al.* Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J.Leukoc.Biol.**, v. 85, 2009, p. 235-242.
- Landry, C.S., Ruppe, M.D, Grubbs, E.G. Vitamin D receptors and parathyroid glands. **Endocr Pract**, v. 17, 2011, p. 63-68.
- Lemonne, N., Lamarre, Y., Romana, M., Mukisi-Mukaza, M., Hardy-Dessources, M.D., *et al.* Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? **Blood**, v. 121, 2013, p. 3054-3056.
- Lette G. *et al.* Dna polymorphisms at the bcl11a, hbs1l-myb, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proc natl acad sci Usa**, v.105, 2008, p. 11869-11874.
- Lim M.Y., Ataga K.I., Key N.S. Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**, v. 20, 2013, p. 472-477.
- Lyra, I.M., Goncalves, M.S., Braga, J.A., Gesteira, M.F., Carvalho, M.H., *et al.* Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad.Saude Publica**, v. 21, 2005, p. 1287-1290.
- Marsh, A., Schiffelers, R., Kuypers, F., Larkin, S., Gildengorin, G., *et al.* Microparticles as biomarkers of osteonecrosis of the hip in sickle cell disease. **Br.J.Haematol**, v. 168, 2015, p. 135-138.
- Manwani, D. e Frenette P.S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Blood**, 2013.
- Milner, P.F., Kraus, A.P., Sebes, J.I., *et al.* Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. **N Engl J Med**, 1991, p. 1476-1481.
- Nejentsev, S. *et al.* Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. **Hum. Mol. Genet**, 2004, p. 1633-1639.
- Nishank, S.S., Singh. M.P., Yadav, R. Clinical impact of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations among sickle cell disease patients of central India. **Eur J Haematol**, v. 91, 2013, p. 462-466.
- Ngo, D., Steinberg, M. Hematology clinic. Sickle cell disease. **Hematology**, v. 19, 2014.
- Nolan, V.G., Baldwin, C., Ma, Q., Wyszynski, D.F., Amirault, Y., Farrell, J.J., Bisbee, A., Embury, S.H., Farrer, L.A., Steinberg, M.H. Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, 2005, p. 266-272.
- Nguyen, A., Nguyen, V., Pham, D., Mravic, M., Scott ,M.A., James, A.W. Novel Signaling Pathways in Osteosarcoma. **International Journal of Orthopaedics**, 2014, p. 73-84.
- Okumura, J.V., Lobo, C.L.C, Bonini-Domingos, C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, 2012, p. 71-72.
- Pandey, S., Mishra, R.M., Sharma, M., Saxena, R. Genotypic influence of  $\alpha$ -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. **Korean J Hematol.**, v. 46, 2011, p. 192-195.
- Patrinos, G.P., Samperi, P., Lo, N.L., Kollia, P., Schiliro, G., *et al.* Evidence for the molecular heterogeneity of sickle cell anemia chromosomes bearing the betaS/Benin haplotype. **Am.J.Hematol.**, v. 80, 2005, p. 79-80.
- Picot, J., Goudot, C., Berkenou, J., Galacteros, F., Colin, Y., *et al.* Flow cytometry analyses reveal association between Lu/BCAM adhesion molecule and osteonecrosis in sickle cell disease. **Am.J.Hematol**, v. 89, 2014, p. 115-117.
- Platt, O.S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N.Engl.J.Med**, 2008, p. 1362-1369.

- Powars, D.R., Hiti, A., Ramicone, E., Johnson, C., Chan, L. Outcome in hemoglobin SC disease: a four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors. **American Journal of Hematology**, v. 70, 2002, p. 206–215.
- Premaor, M.O; Furlanetto, T.W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, 2006, p. 25-37.
- Romana, M., Keclard, L., Froger, A., Lavocat, E., Saint-Martin, C., *et al.* Diverse genetic mechanisms operate to generate atypical betaS haplotypes in the population of Guadeloupe. **Hemoglobin**, v. 24, 2000, p. 77-87.
- Rusanova, I., Cossio, G., Moreno, B., Javier, P.F., De Borace, R.G., *et al.* Beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. **Am.J.Hum.Biol.**, v. 23, 2011, p. 377-380.
- Sammons, J., Ahmed, N., El-Sheemy, M., Hassan, H.T. (2004) Role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). **Stem Cells Dev.**, 2004, p. 273-280.
- Sebastiani, P., Ramoni, M.F., Nolan, V., Baldwin, C.T., and Steinberg, M.H. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat. Genet.**, v. 37, 2005, p. 435–440.
- Silva, C.G.M.; Santos, M.N.; Fortuna, V.A.; Goncalves, M.; Borojevic, R. Caracterização da patologia osteo-articular do joelho em portadores de anemia falciforme. **gazeta médica da bahia**, v. 80, 2010, p. 39-44.
- Silva-Filho, I.L., Leite, A.C., Moura, P.G., Ribeiro, G.S., Cavalcante, A.C., Azevedo, F.C. *et al.* Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, 2011, p. 431-435.
- Silva Junior, G.B., Daher, E.F., Rocha, F.A. Osteoarticular involvement in sickle cell disease. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 2012, p. 156-164
- Silveira, M.P., Guedes, A., Daltro, G. Osteonecrose da cabeça umeral na anemia falciforme. **Gazeta Médica da Bahia**, 2010.
- Soares, A.C., Samico, I.C., Araujo, A.S., Bezerra, M.A., Hatzlhofer, B.L. Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Rev.Bras.Hematol.Hemoter.**, v. 36, 2014, p. 250-255.
- Sonati, M.F., Costa, F.F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J.Pediatr.**, v. 84, 2008, p. 40-51.
- Sorich, M.M., Cherian, J.J., McElroy M.J., Banerjee Jones S.L.C., Minniti, C.P., Mont, M.A. Osteonecrosis of the Hip in Hematologic Disease: A Review of Conditions and Treatment Options. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 25, 2015, p. 253–268.
- Steinberg, M.H., Rosenstock, W., Coleman, M.B., Adams, J.G., Platica, O., Cedeno, M., Rieder, R.F., Wilson, J.T., Milner, P., West, S. Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. **Orphanet J Rare Dis.**, 1984, p. 1353-1360.
- Steinberg, M.H., Hsu, H., Nagel, R.L., Milner, P.F., Adams, J.G., *et al.* Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **Am.J.Hematol.** v. 48, 1995, p. 175-181.
- Steinberg, M.H., Adewoye, A.H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr Opin Hematol**, v. 13, 2006, p. 131-136.
- Steinberg, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **ScientificWorldJournal**, 2008, p. 1295-1324.
- Sutton, M., Bouhassira, E.E., Nagel, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **Am.J.Hematol.** v. 32, 1989, p. 66-69.
- Tanabe, R., Kawamura, Y., Tsugawa, N., Haraikawa, M., Sogabe, N., Okano, T., Hosoi, T., Goseki-Sone, M. Effects of Fok-I polymorphism in vitamin D receptor gene on serum 25-hydroxyvitamin D, bone-specific alkaline phosphatase and calcaneal quantitative ultrasound parameters in young adults. **Asia Pac J Clin Nutr.**, 2015, p. 329-335.
- Uitterlinden, A.G., Fang, Y., Van Meurs, J.B., Pols, H.A., Van Leeuwen, J.P. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene.**, 2004, p. 143-156.
- Ulug, P., Vasavda, N., Awogbade, M., Cunningham, J., Menzel, S., *et al.* Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. **Ann.Hematol.** v. 88, 2009.
- Vilarino, F.L., Bianco, B., Christofolini, D.M., Lerner, T.G., Barbosa, C.P. Análise do polimorfismo Fok1 do gene VDR em mulheres inférteis com endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, 2011, p. 65-69.
- Vukicevic S., Grgurevic, L. BMP-6 and mesenchymal stem cell differentiation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, 2009, p. 441–448.
- Wang, R.N, Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu, O., Lib, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R.C., Kang, R., Mok, J., Lee,

- M.J., Luu, H.L. and Shi, L.L. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. **Genes Dis.**, 2014, p. 87–105.
- Yamamoto, H., Miyamamoto, K.I., Li, B., Taketani, Y., Kitano, M., Inoue, Y., Morita, K., Pike, J.W., Takeda, E. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. **Journal of Bone and Mineral Research**. v.14, n. 2, 1999, p. 240-247.
- Whitfield, G.K., Remus, L.S., Jurutka, P.W., Zitzer, H., Oza, A.K., Dang, H.T., Haussler, C.A., Galligan, M.A., Thatcher, M.L., Encinas Dominguez, C., Haussler, M.R. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.177, n. 1-2, 2001, p. 145-159.
- Wingate, J., Schiff, C.F., Friedman, R.J. Osteonecrosis of the humeral head in sickle cell disease. **J South Orthop** 1996, p. 101-107.
- Yufei, L.I., Bo, X.I. , Kanghua, L.I., Chunyu, W. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women. **Mol Biol Rep.**, v. 39, 2012, p. 5709–5717.
- Zalavras, C.G., Malizos, K.N., Dokou, E., Vartholomatos, G. 2002. The 677→ mutation of the methylene-tetra-hydrofolate reductase gene in the pathogenesis of osteonecrosis of femoral head. **Haematologica**, v. 87 2002, p. 111-112.
- Zhou, Z., Behymer, M., Guchhait, P. Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. **Anemia**, 2011.

## ANEXO I

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

(resolução 196/96; 340/04; 347/05)

**Pesquisa:** “Avaliação dos genes *BMP6* e *VDR* na susceptibilidade à Osteonecrose em pacientes com doença falciforme.”

**Pesquisadores:** Mariana Barros Souto de Souza (Mestranda em genética), Marcos André Cavalcanti Bezerra (PhD), Dr. Aderson da Silva Araújo (PhD), Antonio Roberto Lucena Araújo (PhD).

**Local:** Fundação Hemope / UFPE

A finalidade deste é trazer informações para o paciente sobre o “Avaliação dos genes *BMP6* e *VDR* na susceptibilidade à Osteonecrose em pacientes com doença 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 2 tubos de sangue, obtidos 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.

Consulta de questões éticas:  
Comitê de Ética da Fundação HEMOPE  
Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171 ó  
Fundação HEMOPE  
Telefone: (81) 3416-4660

Pesquisador Bolsista: Mariana Barros Souto de Souza  
Pesquisador Responsável: Dr. Marcos André  
Cavalcanti Bezerra  
Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171 ó Fundação  
HEMOPE; Laboratório de Hemoglobinopatias -  
UNILABE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_ declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo **õAvaliação dos genes *BMP6* e *VDR* na susceptibilidade à Osteonecrose em pacientes com doença falciforme.õ** Autorizo a coleta de 2 tubos de 4ml contendo EDTA, que serão utilizados nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

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

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

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

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

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

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (81) 98008105; Mariana Barros (81) 9874-6947;

Consentimento para participação no estudo:

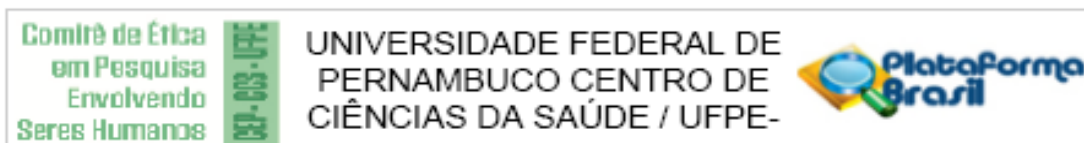
\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

\_\_\_\_\_  
Testemunha

Impressão Digital

## ANEXO II



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos genes BMP6 e VDR na susceptibilidade à osteonecrose em pacientes com doença falciforme.

**Pesquisador:** Mariana Barros

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 59458816.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.792.544

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto de pós graduação intitulado "Avaliação dos genes BMP6 e VDR na susceptibilidade à osteonecrose em pacientes com doença falciforme". Será desenvolvido por Mariana Barros orientada pelo Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra e co-orientada por Aderson da Silva Araújo e Prof. Antônio Roberto Lucena de Araujo no Programa de Pós-Graduação em Genética do Centro de Biociências. O tema a ser abordado na pesquisa foi claramente apresentado, sendo um estudo do tipo corte transversal analítico com comparação de dois grupos, caso e controle. Serão avaliados os genes BMP6 e VDR em relação a susceptibilidade dos pacientes com anemia falciforme para desenvolvimento de osteonecrose. Os autores estimam que a identificação de novos fatores de risco genético às alterações osteoarticulares na doença falciforme é importante para determinação de marcadores prognósticos.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Investigação a associação entre polimorfismos nos genes BMP6 e VDR em pacientes falciformes com avaliação documentada de osteonecrose e sem manifestações clínicas para tal desfecho.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



## ANEXO III

**Tabela complementar 1** - Frequencia observada dos SNPs dos genes *BMP6* e *VDR* para os pacientes HbSC e HbSβ.

		SC			Sβ		
		CASO (10) (N, %)	CONTROLE (45) (N, %)	P-valor	CASO (11) (N, %)	CONTROLE (31) (N, %)	P-valor
<i>VDR</i> rs2228570	CC	8 (80)	29 (64,4)	0,515	8 (72,7)	21 (67,7)	0,935
	CT	2 (20)	12 (26,6)		2 (18,2)	6 (19,3)	
	TT	0 (0)	4 (9)		1 (9,1)	4 (8,7)	
<i>VDR</i> rs11568820	GG	2 (20)	8 (17,8)	0,876	0 (0)	3 (9,7)	0,152
	GA	4 (40)	15 (33,3)		7 (63,6)	10 (32,2)	
	AA	4 (40)	22 (48,9)		4 (36,4)	18 (58,1)	
<i>BMP6</i> rs3812163	TT	0 (0)	5 (11,1)	0,184	2 (18,2)	2 (6,4)	0,497
	TA	1 (10)	13 (28,8)		3 (27,3)	8 (25,8)	
	AA	9 (90)	27 (60,1)		6 (54,5)	21 (67,8)	


## CURRICULO LATTES

### **Mariana Barros Souto de Souza**

#### **Bolsista de Mestrado do CNPq**

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9844342937909889>
  
- Identificação


---

- • **Nome**
- Mariana Barros Souto de Souza 
- • **Nome em citações bibliográficas**
- SOUZA, M. B. S.
  
- Endereço

---

- • **Endereço Profissional**
- Universidade Federal de Pernambuco.  
Av. Prof. Moraes Rego, 1235  
Cidade Universitária  
50670-901 - Recife, PE - Brasil  
Telefone: (81) 21268000  
URL da Homepage: [www.ufpe.br](http://www.ufpe.br)
  
- Formação acadêmica/titulação

---

- • **2015**
- Mestrado em andamento em Genética (Conceito CAPES 4).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil. Orientador: Marcos André Cavancanti Bezerra.  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- • **2010 - 2014**
- Graduação em biomedicina.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
  
- **Resumos publicados em anais de congressos**
  
- **SOUZA, M. B. S.** ; MARTINS, D. A. P. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Avaliação de polimorfismo no gene do *VDR* na susceptibilidade ao desenvolvimento de osteonecrose em pacientes com anemia falciforme. In: XXI Encontro de genética do nordeste, 2016, Recife.
-  MARTINS, D. A. P. ; **SOUZA, M. B. S.** ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Prognostic impact os ANXA2 in the development os osteonecrosis in sikle cell anemia. In: Congresso brasileiro de hematologia, hemoterapia e terapia celular, 2015, São paulo. Prognostic impact os ANXA2 in the development os osteonecrosis in sikle cell anemia, 2015.

## Eventos

---

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

XXI Encontro de genética do nordeste – 2016. (Congresso)  
Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO.  
2015. (Congresso).