

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

DIEGO ARRUDA FALCÃO

**MARCADORES MOLECULARES E SUA RELEVÂNCIA NAS MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

Recife

2018

DIEGO ARRUDA FALCÃO

**MARCADORES MOLECULARES E SUA RELEVÂNCIA NAS MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

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

Área de concentração: Genética Humana

Orientação: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Co-orientação: Dr. Antônio Roberto Lucena-Araújo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Falcão, Diego Arruda

Marcadores moleculares e sua relevância na clínica de pacientes com anemia falciforme / Diego Arruda Falcão. - 2018

95 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena-Araújo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Anemia falciforme. 2. Acidente vascular cerebral. 3. Polimorfismo (Genética). I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Orientador). II. Lucena-Araújo, Antônio Roberto (Coorientador). III. Título.

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 008

DIEGO ARRUDA FALCÃO

**MARCADORES MOLECULARES E SUA RELEVÂNCIA NAS MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

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

Aprovado em: 14/12/2018

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neide Santos (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti (Examinador Externo)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Aderson da Silva Araújo (Examinador Externo)

Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (Examinador Externo)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal de Pernambuco e ao LABCEN, pelo espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa, e à Fundação HEMOPE, pelas amostras fornecidas,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra por toda ajuda nesse período, pela grande contribuição para meu conhecimento e crescimento profissional, por estar sempre disposto a ajudar e pela amizade;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antônio Roberto pela disponibilidade, e ajuda sempre que possível, por todas as sugestões e também pela amizade construída.

A todos os colegas de laboratório

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

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

À minha noiva Natasha Porto, por estar sempre disposta a me ouvir nas horas ruins, por me incentivar e não me deixar desistir nunca, por estar presente em todos os momentos, sejam bons ou ruins, e por me apoiar sempre;

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

Os meus sinceros agradecimentos

Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças.

(HAWKING, 2006)

RESUMO

Embora seja considerada como a doença monogênica mais comum no mundo a anemia falciforme (AF) é multifatorial. Alterações genéticas adicionais (deleção do gene alfa, haplotipo beta-S, dentre outros), fatores socioeconômicos, ambientais e idade podem contribuir significativamente para essa diversidade clínica. Dentre as principais complicações clínicas observadas em paciente com AF, merece destaque (por sua morbimortalidade) o acidente vascular cerebral (AVC, na infância) e úlceras de membros inferiores (UM, na fase adulta). O presente estudo tem como objetivo investigar polimorfismos em genes associados com vias de inflamação (*IL6*) e reparo tecidual (*TGFβ2*, *TGFβ3*, *SMAD7*, *SMURF1*) relacionados com o desenvolvimento de AVC e UM, respectivamente. No total, 591 (275 adultos; 316 crianças) pacientes atendidos na Fundação HEMOPE foram estudados. Para coorte infantil (pacientes com <18 anos), o polimorfismo *IL6* G174C está associado com AVC ($P < 0,001$), enquanto que polimorfismos *TGFβ3* rs2038931 ($P = 0,025$), *SMAD7* rs736839 ($P < 0,001$) e *SMURF1* rs219825 ($P = 0,041$) foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento de UM. Corroborando com esses achados, pacientes adultos com UM e genótipo de risco para o polimorfismo *TGFβ3* rs2038931 apresentam níveis significativamente mais elevados do ligante TGFβ1 ($P = 0,041$), sugerindo um mecanismo compensatório para a ativação da via. Nossos achados reforçam a ideia de que marcadores moleculares exercem um importante papel na fisiopatologia da AF.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Acidente vascular cerebral. Interleucina 6. Úlceras maleolares. Via do TGF-β.

ABSTRACT

Although it is considered the most common monogenic disease in the world, clinical presentation of patients with sickle cell anemia (SCA) is multifactorial. Additional genetic abnormalities (deletion of the alpha gene, beta-S haplotype, among others), socioeconomic, environmental factors and age may significantly contribute to its clinical diversity. Among the main clinical complications frequently observed in patients with SCA, stroke (in childhood) and leg ulcers (in adults) are worth mentioning because of their morbidity and mortality. Here, we set out to investigate polymorphisms in genes associated with inflammatory pathways (IL6) and tissue repair (TGF β R2, TGF β R3, SMAD7, SMURF1) related to the development of stroke and leg ulcers, respectively. Overall, 591 non-related patients (275 adults, 316 children) followed at the HEMOPE Foundation were enrolled. For the infant cohort, the *IL6* G174C polymorphism is associated with stroke ($P<0.001$), whereas the *TGFBR3* rs2038931 polymorphism ($P=0.025$), *SMAD7* rs736839 ($P<0.001$) and *SMURF1* rs219825 ($P=0.041$) were associated with increased risk for leg ulceration. Corroborate these findings, adult patients with leg ulcers and the risk genotype for the TGF β R3 rs2038931 polymorphism have higher levels of the TGF β 1 ligand ($P=0.041$), suggesting a compensatory mechanism for pathway function. Our findings reinforce the idea that molecular markers play an important role in SCA pathophysiology

KEY WORDS: Sickle cell disease. Stroke. Interleukin 6. Leg Ulcers. TGF- β Pathway.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Frequência da Hemoglobina S nas diferentes regiões do Brasil (Cançado e Jesus, 2007).....	18
Figura 2 - Alteração estrutural de eritrócitos com hemoglobina S. (Adaptado: Frenette & Atweh, 2007).....	20
Figura 3 - Fisiopatologia da anemia falciforme. Mutação na 6 ^a posição no gene da globina β , levando a formação de uma hemoglobina an�mala, a HbS, que sofre uma polimerização em baixas concentrações de oxig�nio (Steinberg, 2008).....	21
Figura 4 - Fisiopatologia da anemia falciforme. (Modificado de Dutra e Bozza 2014).....	23
Figura 5 - Taxas de risco de acidente vascular cerebral isqu�mico e hemorrágico em pacientes falciformes, de acordo com a idade. (—) AVC isqu�mico; (----) AVC hemorrágico (Ohene-Frempong et al., 1998).....	24
Figura 6 - DTC na faixa alterada (Velocidade de fluxo média de 204 cm/s) de crianç�a com anemia falciforme. (Fonte: HEMOMINAS).....	26
Figura 7 - Fotografia representativa da úlcera de membros inferiores, com comprometimento do maléolo medial direito (McMahon, et al 2010).....	31
Figura 8 - Imagens de úlceras maleolares de pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope. Fonte: Fotos cedidas por Carolina Sanuzi.....	32
Figura 9 - Desenho esquemático ilustrando a via de sinalização do TGF- β . Transdução de sinal superfamília TGF- β /BMP. (Adaptado de Rubtsov & Rudensky, 2007).....	37

Figura 10 - Domínios estruturais das SMADs (Adaptado de Samanta & Datta, 2012).....	38
Figura 11 - Funções do TGF- β na cicatrização de lesões teciduais (Adaptado de Werner & Grose, 2003).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HU	Hidroxiureia
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido Nítrico sintase
KDa	Kilodalton
<i>KL</i>	<i>Klotho</i>
NO	Óxido nítrico
P	Significância
Ph	Potencial Hidrogeniônico
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SMAD	Derivado de uma definição homóloga do gene Mad em drosófilas
P	Significância
Ph	Potencial Hidrogeniônico
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
	Derivado de uma definição homóloga do gene Mad

SMAD	em drosófilas
SMURF	Do inglês, <i>SMAD ubiquitination regulatory factors</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 ANEMIA FALCIFORME.....	17
2.1.1 Epidemiologia e Etiologia	17
2.1.2 Fisiopatologia	19
2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	23
2.2.1 Prevenção da Doença Cerebrovascular Falciforme	25
2.2.1.1 Doppler Transcraniano (DTC).....	25
2.2.1.2 Hidroxiuréia (HU).....	27
2.2.2 Transfusões Crônicas	28
2.3 INFLAMAÇÃO.....	29
2.3.1 Interleucina 6	29
2.4 ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES.....	31
2.4.1 Classificação	32
2.4.2 Tratamento e Prevenção	33
2.4.3 Fatores Genéticos na Úlceras maleolares	34
2.5 FATOR TRANSFORMADOR DO CRESCIMENTO (TGF-B).....	35
2.5.2 Via de Sinalização do TGF-β	36
2.5.3 Regulação negativa da via de sinalização do TGF-β	38
2.5.4 Papel biológico do TGF-β	39
2.6 VARIÁVEIS GENÉTICAS NO ESTUDO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ANEMIA FALCIFORME.....	42

3 INTERLEUKIN-6 G-174C POLYMORPHISM PREDICTS HIGHER RISK OF STROKE IN SICKLE CELL ANAEMIA.....	44
4 ASSOCIATION OF TGF-B PATHWAY POLYMORPHISMS WITH DEVELOPMENT OF LEG ULCERS IN SICKLE CELL ANEMIA.....	53
5 DISCUSSÃO GERAL.....	68
6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXO A - NORMAS DA REVISTA "BLOOD".....	83
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	95

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva de distribuição mundial, causada por uma mutação pontual no gene da globina β (*HBB*), devido à substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição do gene da cadeia β globínica (β^6 GAG→GTG; glu⁶→val⁶), levando a formação de uma hemoglobina (Hb) anormal, a hemoglobina S (HbS). Em condições de estresse, como diminuição do pH e da biodisponibilidade de oxigênio, desidratação e baixos níveis da Hb fetal (HbF), a HbS forma um polímero que se deposita na membrana das hemácias, modificando a forma dos eritrócitos, tornando-os falciformes. Decorrente deste fenômeno, as hemácias tornam-se rígidas e susceptíveis a hemólise, caracterizando a AF como uma anemia hemolítica crônica, e sendo responsáveis pela oclusão vascular, episódios de dor e lesão de órgãos alvo que representam os fenômenos principais dessa doença.

Uma das características marcantes da doença falciforme é a variabilidade de suas manifestações clínicas, e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas, variando de formas quase assintomáticas até clinicamente graves, responsáveis por alta mortalidade na infância. Algumas das complicações clínicas comprometem consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, dentre elas, estão o acidente vascular cerebral (AVC) e as úlceras de membros inferiores ou úlceras maleolares (UM). O AVC é um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma artéria ou a uma hemorragia, com posterior isquemia tecidual e/ou sinais e sintomas neurológicos. Na AF, 25% dos pacientes apresentam manifestações cerebrovasculares, sendo muito importante a busca de indicadores mais específicos de prognóstico que melhorariam os tratamentos profiláticos, como as transfusões crônicas e o uso da hidroxiuréia, nos pacientes de alto risco para o AVC.

Fatores genéticos que predis põem pacientes portadores de AF a desenvolver um AVC não estão bem estabelecidos e marcadores clássicos da AF, tais como o haplótipo β^S e a coerança entre a AF e a talassemia α , parecem estar modulando os fenótipos da AF. Entretanto, polimorfismos de base única em genes relacionados com vias de inflamação, regulação vascular, resposta ao estresse

oxidativo, adesão celular e hemostasia aparecem como possíveis candidatos para prever o desenvolvimento do AVC na AF.

Além disso, pacientes com AF apresentam um aumento de mediadores inflamatórios, adesivos e trombóticos, caracterizando a AF como uma doença de caráter inflamatório crônico. Dessa maneira, a ativação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode estar relacionada ao desenvolvimento e evolução do AVC, classificando os polimorfismos em genes inflamatórios, como a *IL6*, como possível modulador desse evento clínico.

As UM desenvolvem-se em áreas com redução do tecido subcutâneo, pele fina, e com diminuição do fluxo sanguíneo e as regiões mais afetadas são as porções de maléolo medial e lateral, muitas vezes tornando-se circunferencial se não for controlada precocemente.

A variabilidade na ocorrência das UM, pode sofrer influência do meio ambiente, das condições sociais e por diferenças genéticas e o curso patológico segue paralelamente com os fenômenos crônicos de hemólise intravascular. O aparecimento das lesões, por muitas vezes decorre de traumas ou de forma espontânea e a lesão ainda pode ser agravada pela colonização de bactérias. Dessa forma, existe a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precocemente possível na nossa população, de forma que medidas preventivas poderão ser tomadas, evitando que os pacientes sofram complicações futuras e intervenções cirúrgicas. Neste contexto, destaca-se o papel da via do fator transformador do crescimento do tipo beta (TGF- β).

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica com atuação importante na regulação do processo de cicatrização, reepitelização, inflamação local e formação de granulação do tecido. O mecanismo para estimulação dessas funções depende da interação do TGF- β com seus respectivos receptores localizados na superfície celular e o sinal emitido desencadeará a ativação de diferentes vias de sinalizações intracelulares, ativando genes inflamatórios e reparadores.

Dessa forma, a via de ativação do TGF- β parece exercer um papel fundamental na cicatrização das úlceras em pacientes falciformes. Portanto, investigar o papel de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) nos genes *TGF β R2*,

TGF β R3, SMADs e SMURFs e a dosagem de proteínas importantes para a via pode nos fornecer caminhos para esclarecer mecanismos fisiopatológicos das UM e considerando que pacientes com anemia falciforme apresentam muitas vezes quadros clínicos variados que dificultam a tomada de decisão terapêutica e de cuidados de saúde em geral, a identificação de padrões biológicos que influenciem na modulação fenotípica, é muito útil e de grande impacto na melhoria da sobrevida e da qualidade de vida dos doentes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar polimorfismos em genes associados com vias de inflamação e reparo tecidual e associar esses com o desenvolvimento de acidente vascular cerebral (AVC) e úlceras de membros inferiores (UM), respectivamente, em pacientes com anemia falciforme.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar a associação do polimorfismo *IL6* (rs1800795) frente à susceptibilidade a ocorrência da doença cerebrovascular na coorte pediátrica e de adultos jovens de pacientes com anemia falciforme;
- Investigar a associação dos polimorfismos nos genes *TGF β R2* (rs1019856), *TGF β R3* (rs2038931), *SMAD7* (rs736839) e *SMURF1* (rs219825) com o desenvolvimento da úlcera de membros inferiores em pacientes adultos com anemia falciforme;
- Dosar o ligante TGF β 1 em pacientes adultos com anemia falciforme, portadores de úlcera de membros inferiores de acordo com do polimorfismo no gene *TGF β R3* (rs2038931)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Epidemiologia e Etiologia

A anemia falciforme (AF) é uma das doenças hereditárias mais comuns no mundo. Cerca de 2% da população mundial apresentam a mutação, além de nascer entre 300.000-400.000 crianças falciformes a cada ano (Rusanova et al., 2011; Kapoor, 2018). Segundo dados do Ministério da Saúde no Brasil, a prevalência estimada da AF é de 25.000 a 30.000 casos, com incidência de 3.500 novos casos por ano, ocorrendo predominantemente, entre afro descendentes (Brasil, 2012; Soares et al., 2014). Estudos sugerem que essa mutação teve origem na África e Ásia (Nagel e Labie, 1989), sendo introduzida ao Brasil pelo tráfico de escravos oriundos de tribos africanas no período colonial escravagista. Como a presença do negro africano contribuiu, em grande parte, para a formação étnica da população brasileira, a hemoglobinopatia S é a mais frequente no país: estima-se que 5-6% da população seja portadora do alelo β^s e que, a cada ano, nascem entre 700-1000 crianças portadoras da AF (Lyra et al. 2005).

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

Devido ao processo histórico de colonização do Brasil, há uma distribuição heterogênea do gene β^s no país, dependendo da composição negroide ou caucasoide da população. Assim, a prevalência de heterozigotos para a hemoglobina S (HbS) é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste é em torno de 2% a 3% (Cançado & Jesus, 2007).

Em 2001, o Ministério da Saúde, mediante a portaria nº822/01, determinou que a pesquisa de hemoglobinopatias fosse realizada como parte do Programa de Triagem Neonatal. Dessa forma, o levantamento epidemiológico de nascidos vivos com HbS nas regiões brasileiras é facilitado. Na figura 1, é possível observar que estados que utilizaram mais intensamente a mão de obra escrava, como

Pernambuco, apresentam maior número de indivíduos portadores dessa hemoglobina (Cançado e Jesus 2007; Wagner et al. 2010).

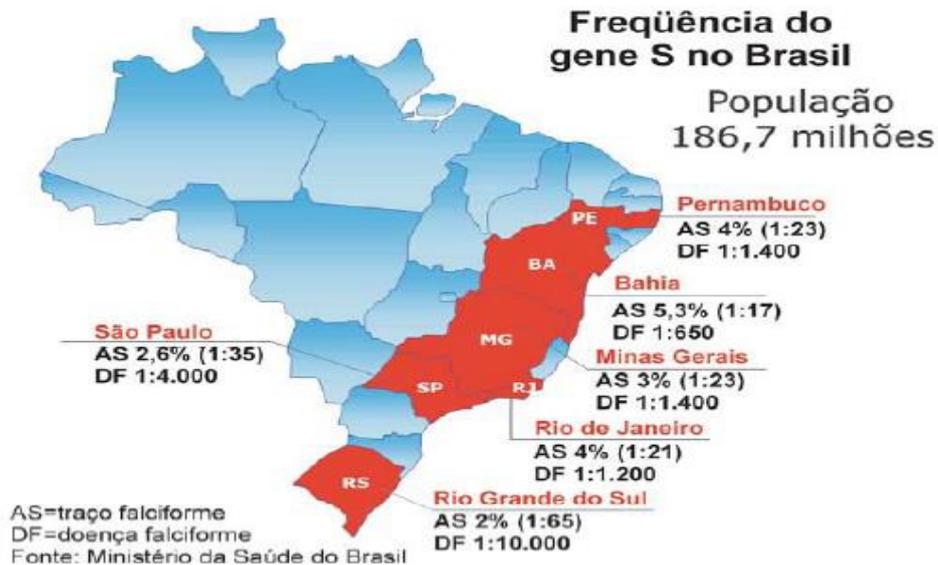


Figura 1: Frequência da Hemoglobina S nas diferentes regiões do Brasil (Cançado e Jesus, 2007).

A AF é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente entre afro descendentes (Cançado & Jesus, 2007). A causa da doença é uma mutação de ponto ($GAG \rightarrow GTG$) no gene da globina beta da hemoglobina (Hb), originando uma Hb anormal, a Hb S (HbS), ao invés da Hb normal denominada Hb A (HbA). Essa mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia β , e conseqüentemente ocorre modificação físico-química na molécula da HbA (Ballas et al., 1996; Darrow et al., 2016).

A herança da HbS pode ocorrer em hetero ou homozigose, sendo esta última condição, a mais grave e comum, chamada anemia falciforme (Naoum 2000), que foi a primeira doença molecular descrita, sendo, desde então, intensamente estudada (Sonati e Costa 2008; Fertrin e Costa 2010). Quando em heterozigose com outra hemoglobina variante, diz-se que o indivíduo é portador de doença falciforme, a qual é de gravidade variável e, quando herdada com HbA, diz-se que apresenta o traço falciforme, condição comumente benigna, uma vez que as concentrações de HbS são inferiores a 50% nos eritrócitos (Araújo et al. 2004).

2.1.2 Fisiopatologia

A anormalidade estrutural da HbS é o ponto chave que leva às complicações clínicas nos indivíduos com doenças falciformes. Em condições de baixas concentrações de oxigênio, diminuição do pH e baixas concentrações de hemoglobina fetal (HbF), a HbS sofre uma polimerização devido a interação entre os resíduos hidrofóbicos dessa molécula, formando estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falciformes, característica esta que leva ao nome da doença (Zago e Pinto 2007; Rees et al., 2010; Kato et al., 2017). A falcização também altera as propriedades da membrana celular, reduzindo sua flexibilidade e promovendo uma maior aderência ao endotélio vascular (Zhou et al., 2011).

Os efeitos destas alterações levam a um desequilíbrio físico-químico na hemácia, promovendo diminuição no efluxo de potássio, aumento do cálcio intracelular e a interrupção da ligação da membrana com proteínas do citoesqueleto, em especial da banda 3, causando a exposição de moléculas da membrana celular como fosfatidil-serina (FS) figura 2 (Frenette & Atweh, 2007; Zago & Pinto, 2007).

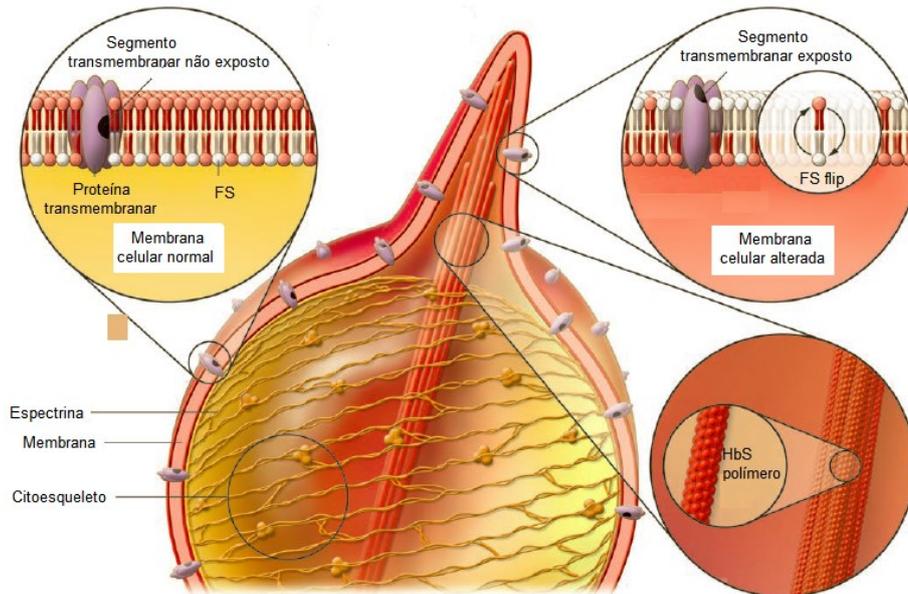


Figura 2 - Alteração estrutural de eritrócitos com hemoglobina S. A desoxigenação da Hb S induz uma alteração conformacional, na qual há formação de polímeros que perturbam o citoesqueleto dando origem à característica de hemácia em foice. A interrupção da ligação da membrana com o citoesqueleto resulta na exposição de epítomos de proteínas transmembranar, e na composição de fosfatidilserina (FS) entre o interior e o exterior da célula (Adaptado: Frenette & Atweh, 2007)

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

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

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

O acúmulo de polímeros de HbS dentro das hemácias falcizadas resulta em uma lesão celular e, em larga escala, os eritrócitos danificados promovem os efeitos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando o fenótipo principal da AF (Steinberg, 2008) (Figura 3). Além desses fatores, há um quadro de inflamação crônica nos indivíduos (Conran et al. 2009; Rees et al. 2010; Singhal et al. 2016).

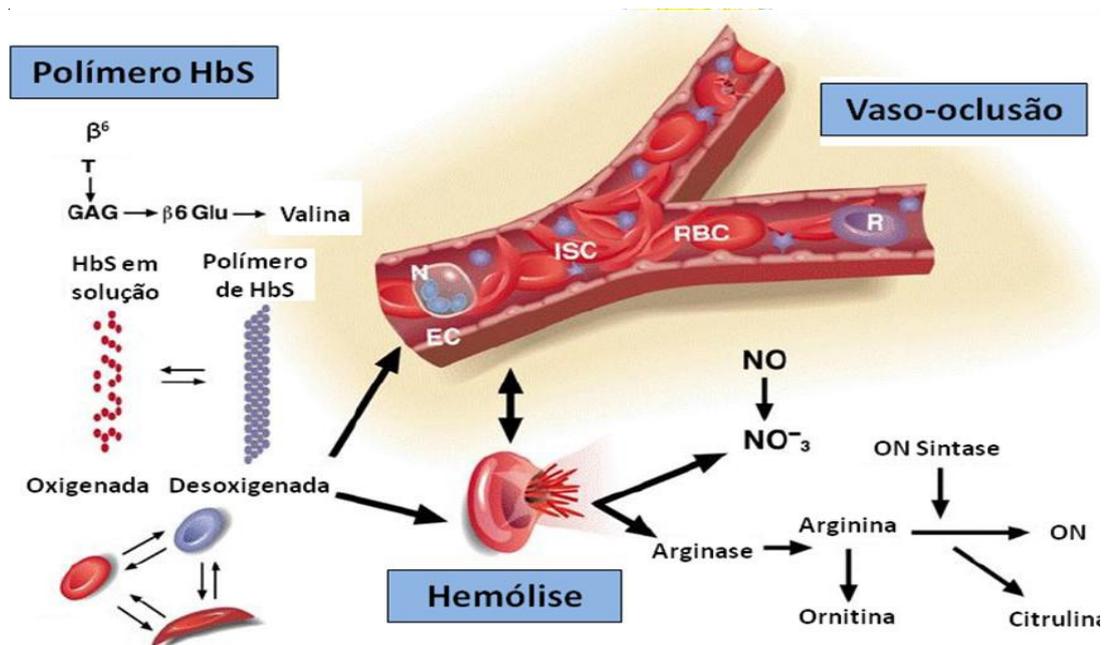


Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme. Mutação na 6^a posição no gene da globina β , levando a formação de uma hemoglobina an mala, a HbS, que sofre uma polimerização em baixas concentrações de oxig nio. O polímero de HbS danifica o eritrócito, diminuindo sua vida útil (hemólise) e aumentando o consumo de óxido nítrico, além de promoverem uma vaso-oclusão (Steinberg, 2008).

Pacientes falciformes, por desenvolverem hemácias falcizadas que apresentam um tempo de vida mais curto, cursam com um elevado grau de hemólise. Devido à hemólise crônica, os pacientes portadores de AF apresentam altos níveis de hemoglobina plasmática que seq estram o óxido nítrico (NO), diminuindo sua disponibilidade, levando ao desenvolvimento de algumas manifestações clínicas da doenç  falciforme. Na AF, a hemólise ocorre extravascularmente através de um reconhecimento das hemácias danificadas por células do sistema reticuloendotelial. Entretanto, esse processo também pode ocorrer dentro dos vasos, podendo corresponder até 30% da hemólise total de um paciente falciforme (Steinberg, 2008; Armenis et al., 2017). Quando a hemólise ocorre dentro dos vasos, libera hemoglobina livre e arginase. A hemoglobina livre

consome o NO formando metehemoglobina e gerando espécies oxidantes que também consomem NO, além de lesar o endotélio gerando processo inflamatório. A arginase, por sua vez, promove a conversão da L-arginina (substrato da síntese do NO) em L-ornitina, reduzindo, assim, a biodisponibilidade do NO e a depleção desse vasodilatador leva então, a fenômenos que contribuem para a ocorrência da vaso-occlusão, como vaso constricção, ativação plaquetária e aumento da aderência ao endotélio vascular (Kato et al. 2007).

Outro importante fator envolvido na fisiopatologia da AF é a vaso-occlusão. Acredita-se que o processo de vaso-occlusão é resultado de um complexo cenário envolvendo interações de diferentes tipos celulares, incluindo células falcizadas, reticulócitos, células endoteliais, leucócitos, plaquetas, além de citocinas e fatores teciduais (Capellini, 2007; Morris, 2008; Lanaro et al., 2009; Sakamoto et al., 2013).

Os eritrócitos falciformes apresentam maior concentração de moléculas de adesão em sua superfície, favorecendo o processo de interação com o endotélio e com outros componentes da circulação, como leucócitos e plaquetas. Uma das moléculas de adesão exposta em grande quantidade pelo eritrócito falcizado é a fosfatidilserina, que o deixa até três vezes mais aderente quando comparado aos eritrócitos normais (Zago e Pinto 2007). Além dessa maior aderência, a exposição da fosfatidilserina foi correlacionada com a geração de trombina, substância relacionada à formação de coágulos de fibrina, que também contribuem para a oclusão vascular (Hebbel 1997).

Vaso-occlusões recorrentes, processos de isquemia-reperfusão e consequente ativação do endotélio vascular induzem a contínuas respostas inflamatórias na anemia falciforme, que se propagam por níveis elevados de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e estresse oxidativo (Conran et al., 2009).

Pode-se perceber então, que a nível molecular, todo o processo vaso-oclusivo, hemolítico e inflamatório está relacionado (Figura 4), sendo eles os responsáveis pelas complicações clínicas apresentadas pelos indivíduos portadores de AF (Zago e Pinto 2007).

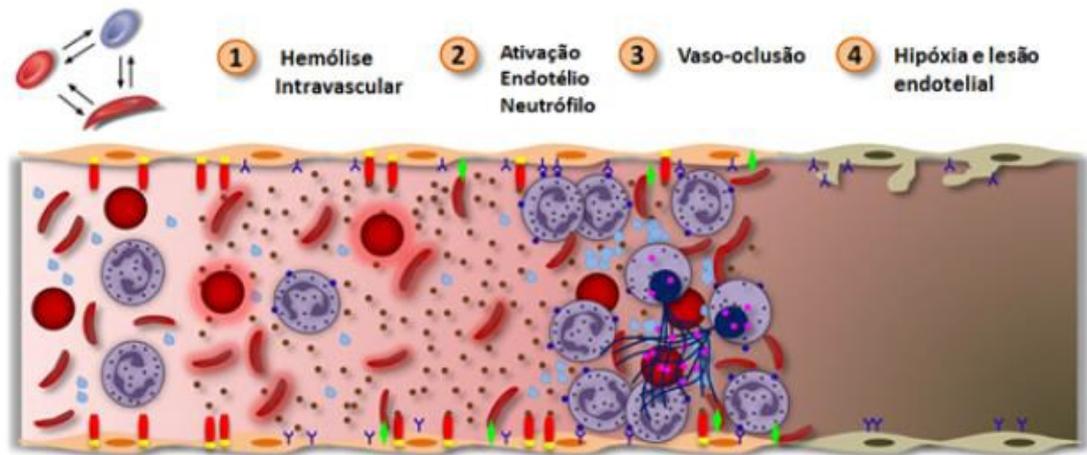


Figura 4: Fisiopatologia da anemia falciforme. A forma alterada e rígida do eritrócito devido à polimerização da HbS induz o processo de vaso-occlusão e hemólise. (1) Eritrócitos falcizados levam à hemólise intravascular, a qual libera hemoglobina livre (consequentemente, heme) e arginase no plasma. (2) O grupamento heme ativa neutrófilos e células endoteliais que induzem a expressão de moléculas de adesão. (3) A Hb livre e a arginase diminuem a biodisponibilidade de NO provocando vasoconstrição; e células endoteliais ativam a coagulação levando à adesão de plaquetas ao endotélio com participação de eritrócitos e neutrófilos. (4) Dependendo da extensão da vaso-occlusão, os tecidos podem apresentar hipóxia e necrose. (Modificado de Dutra e Bozza 2014).

Dessa maneira, a AF cursa de forma crônica marcada por episódios agudos que comprometem a qualidade de vida dos doentes. Com o passar dos anos, a isquemia e a hemólise crônica promovem lesões progressivas em órgãos como pulmão, coração, cérebro, rim e outros órgãos (Rees et al., 2010). Durante a infância os pacientes com AF cursam, em alguns casos com uma clínica branda, onde as lesões só se manifestam na fase adulta (Quinn et al, 2004) e os danos aos órgãos podem ser sintomáticos ou silenciosos, episódicos ou progressivos. Hipertensão pulmonar, osteonecrose, disfunções cognitivas decorrentes de acidente vascular cerebral e úlcera de membros inferiores, são exemplos de algumas das complicações crônicas graves da AF (Steinberg, 1999; Nouraie et al., 2013).

Portanto, não há um evento único responsável pelas manifestações clínicas na AF, mas fatores como a hemólise e a vaso-occlusão contribuem para o seu surgimento sendo agravada ainda por fatores externos e alterações genéticas (Kato et al., 2007; Nouraie et al., 2013).

2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O AVC pode ser definido como um evento neurológico agudo secundário à oclusão de uma artéria ou a uma hemorragia, com consequente isquemia e/ou sinais e sintomas neurológicos. Em pacientes com AF, crianças entre 1-9 anos são

consideradas como a faixa etária mais predisponente para desenvolver o AVC (Ohene-Frempong et al., 1998; Asbeutah et al., 2018). Além disso, os acidentes vasculares cerebrais isquêmicos apresentam uma grande incidência em pacientes falciformes menores de 20 anos, com um pico entre 7 e 11 anos, além de acometer adultos maiores de 30 anos. Já o acidente vascular cerebral hemorrágico acomete principalmente adultos falciformes entre 20-30 anos (Kato et al., 2009) (Figura 5).

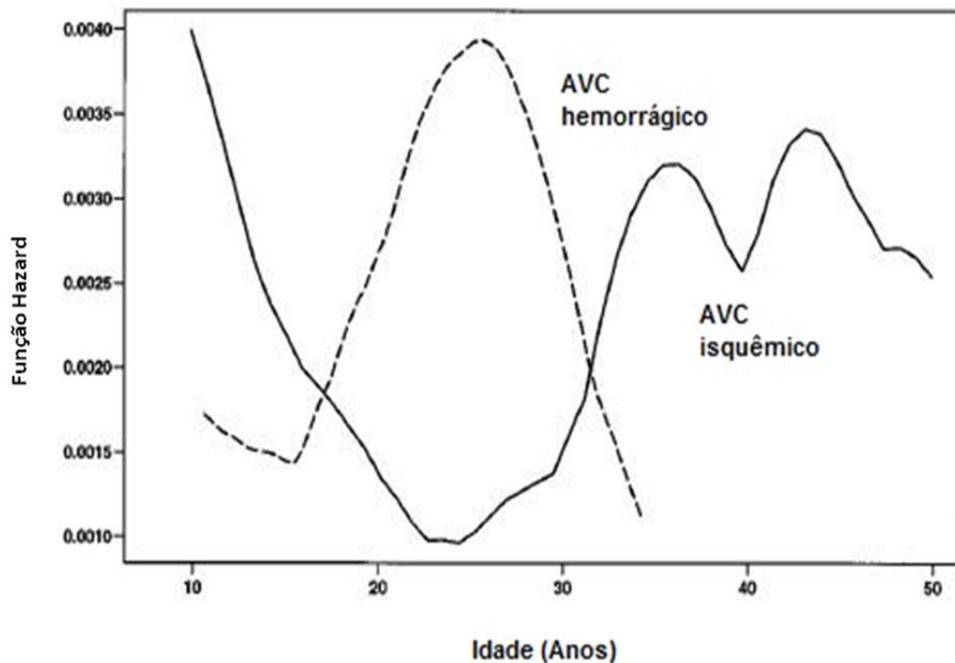


Figura 5: Taxas de risco de acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico em pacientes falciformes, de acordo com a idade. (—) AVC isquêmico; (-----) AVC hemorrágico (Ohene-Frempong et al., 1998).

A AF pode contribuir para o desenvolvimento do AVC por criar uma fonte persistente de lesão endotelial em consequência a hipóxia, aumentar a tensão de cisalhamento, promover uma maior adesão das hemácias falcizadas ao endotélio, além da inflamação gerada pela lesão de reperfusão. Estes efeitos levam a produção de citocinas, promovendo uma disfunção endotelial, aumento de mediadores inflamatórios, adesivos e trombóticos, além de inibir a produção de mediadores citoprotetores, como o óxido nítrico (Phelan & Faller, 1996; Solovey et al., 1997; Fasano et al., 2015).

Na AF, o acidente vascular cerebral é uma das principais causas de óbito em crianças e adultos. O AVC, isoladamente, é responsável por 20% dos óbitos de crianças com doença falciforme entre 5-10 anos; além disso, 70% das crianças que desenvolvem o AVC apresentam déficit motor e significativo déficit cognitivo (Ohene-Frempong et al., 1998; Zhou et al., 2011; Naik et al., 2018). Ademais, crianças portadoras de anemia falciforme possuem um risco 300x maior de desenvolver um acidente vascular cerebral, tornando assim a AF a maior causadora de AVC durante a infância. A recorrência do AVC é frequente e acontece em cerca de 70% destes pacientes, geralmente nos três primeiros anos após o primeiro acidente cerebrovascular (Hoppe et al., 2007; Zhou et al., 2011).

Fatores que predis põem pacientes com anemia falciforme a essa complicação não estão bem estabelecidos (Sarnaik & Ballas, 2001). Apesar da etiologia do AVC não ser bem compreendida, estudos sugerem a existência de um componente genético, além da mutação pontual na globina β . Os principais candidatos para a avaliação da predisposição do AVC em pacientes falciformes incluem genes envolvidos na lesão endotelial, trombose e inflamação (Hoppe et al., 2007).

Por apresentar uma alta incidência na AF, são necessários testes prognósticos que possam identificar precocemente pacientes que possuam alto risco de desenvolver o AVC. A identificação precisa pode contribuir para um tratamento preventivo, diminuindo a ocorrência de acidentes vasculares cerebrais primários em portadores de AF (Flanagan et al., 2011; Bernaudin et al., 2014).

2.2.1 Prevenção da Doença Cerebrovascular Falciforme

2.2.1.1 Doppler Transcraniano (DTC)

Dentre os pacientes com AF que desenvolveram o AVC, 70-90% apresentam vasculopatia estenótica dos grandes vasos cerebrais (Hsu et al., 2003). A ultrassonografia através do Doppler Transcraniano (DTC), método não invasivo que determina as velocidades de fluxo sanguíneo das artérias cerebrais, identifica as crianças com risco elevado para o desenvolvimento do AVC pela detecção precoce dessa vasculopatia, permitindo que se faça a profilaxia primária da ocorrência desse evento (Adams et al., 1992; Flanagan et al., 2011; Connes et al., 2013; Prakash, 2018). O risco do AVC é diretamente proporcional ao aumento da velocidade média

nas artérias cerebrais, como as artérias carótidas internas distais e cerebrais médias proximais (Adams et al., 2004; Flanagan et al., 2011).

Crianças com AF, por apresentarem ossos cranianos mais finos e janelas acústicas maiores, têm velocidade de fluxo cerebral detectada de modo mais fácil que os adultos pelo DTC. Entretanto, cerca de 5% das crianças apresentam DTC inadequado, por não se conseguir mensurar o fluxo sanguíneo (Adams et al., 2004; Hoppe, 2005). Porém, aproximadamente 19% das crianças falciformes, mesmo com DTC normal, podem vir a desenvolver um AVC (Adams et al., 2004).

Devido à anemia, crianças falciformes apresentam DTC ainda maiores (Velocidade de fluxo 130-140 cm/s) do que crianças sem AF (Velocidade de fluxo 90-100 cm/s). Velocidades de fluxo cerebral acima de 140 cm/s podem indicar uma estenose cerebral ou apenas um aumento geral no fluxo sanguíneo cerebral (HOPPE, 2005). Crianças falciformes com DTC alterado (Velocidade de fluxo ≥ 200 cm/s) apresentam 44x mais chances de desenvolver um AVC do que as que tem DTC normal (Velocidade de fluxo ≤ 170 cm/s). Entretanto, o valor de 200 cm/s não é absoluto, visto que pacientes que apresentam DTC em faixa condicional (Velocidade de fluxo 170-199 cm/s) também apresentam elevado risco de desenvolver o AVC (Flanagan et al., 2011) (Figura 6).

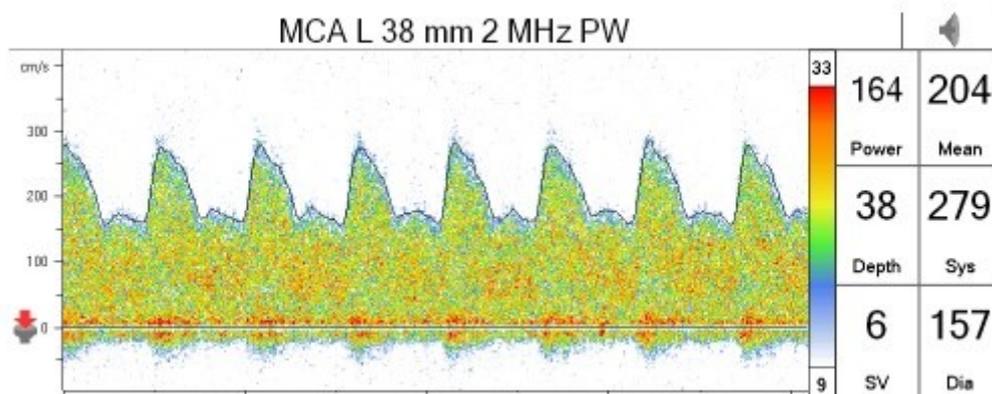


Figura 6: DTC na faixa alterada (Velocidade de fluxo média de 204 cm/s) de criança com anemia falciforme. (Fonte: HEMOMINAS).

2.2.1.2 Hidroxiuréia (HU)

Atualmente, a hidroxiuréia (HU), agente quimioterápico leve, inicialmente utilizado nas doenças onco-hematológicas, é a única droga aprovada capaz de modificar o curso clínico da doença, por melhorar os parâmetros hematológicos e diminuir o número de crises dolorosas e hospitalizações dos pacientes com AF (Charache et al., 1995; Rosse et al., 2000; Wang et al., 2011; Menzel, 2018). Os efeitos benéficos da HU, um inibidor da fase S do ciclo celular, são atribuídos a sua capacidade de aumentar a produção de hemoglobina fetal (HbF), codificada pelo gene da globina γ (*HBG*), em células progenitoras eritróides através de uma via dependente de GMPc, aumentando a concentração final de HbF na hemácia falcizada e inibindo, assim, a polimerização da HbS (Cokic et al., 2003). Além disso, alguns estudos sugerem que a HU pode promover benefícios por mecanismos não relacionados a indução de HbF, como um efeito anti-inflamatório na diminuição do número de leucócitos, citocinas e moléculas de adesão e um aumento da produção de óxido nítrico (Zimmerman et al., 2004; Cokic et al., 2006, Platt, 2008; Green & Barral, 2014; Yawn et al., 2014).

A hemoglobina fetal (HbF) é a molécula mais estudada como modulador genético na AF. Por não participar do polímero de HbS e, conseqüentemente, diminuir a formação deste mesmo polímero, o aumento dos níveis de HbF pode melhorar o curso clínico do paciente falciforme. Pacientes com AF apresentam índices de HbF variando entre 1-30% (média de 8%), modulados, em parte, pelos haplótipos da globina β . No entanto, ter o conhecimento do nível de HbF de um paciente falciforme é insuficiente para prever as possíveis complicações clínicas. Alguns pacientes apresentam graves complicações da doença mesmo apresentando níveis de HbF em torno de 20% (Wyszinski et al., 2004; Akinsheye et al., 2011).

Crianças com AF apresentam uma maior sobrevida após o tratamento com HU, principalmente pela diminuição do desenvolvimento de síndrome torácica aguda e infecções. Além disso, uma diminuição dos níveis de reticulócitos e neutrófilos, fatores de risco já estabelecidos da doença falciforme, tem sido descrita após o tratamento com essa droga (Lobo et al., 2013). Ademais, estudos prévios já demonstraram que a terapia com HU tem sido associada com uma diminuição das

velocidades de fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais, mensurado pelo DTC, e com uma menor taxa de recorrência do AVC (Ali et al., 2011; Lagunju et al., 2015).

Por se tratar de um agente quimioterápico, o uso da HU foi questionado inicialmente devido aos possíveis efeitos adversos que poderiam ser causados a um longo prazo. Entretanto, vários estudos de acompanhamento de pacientes falciformes que utilizaram a droga foram realizados, não se encontrando associação entre a HU e possíveis efeitos neoplásicos (Steinberg et al., 2003; Ballas et al., 2009; Steinberg et al., 2010).

Sendo assim, o uso da HU tem sido cada vez mais incentivado em pacientes com AF (Steinberg et al., 2003; Steinberg et al., 2010). Apesar de conter alguns efeitos adversos temporários, como leucopenia e plaquetopenia, que poderiam predispor os pacientes a infecções e sangramentos, o risco do uso da HU em pacientes falciformes é aceitável quando comparado com o risco de pacientes falciformes não tratados (Brawley et al., 2008).

2.2.2 Transfusões Crônicas

A identificação de pacientes com risco para o desenvolvimento do AVC por um método de triagem, como o DTC, permite a administração precoce de transfusões profiláticas, beneficiando o portador de AF (Steinberg, 2005). Manter o nível de HbS em torno dos 30% é recomendado como prevenção do AVC primário e secundário em crianças de 2-16 anos, com o uso de terapias baseadas em transfusões crônicas. Apesar de sua eficácia em prevenir o AVC, transfusões crônicas apresentam riscos associados, como infecções, aloimunizações e sobrecarga de ferro, necessitando de uma terapia quelante (Vichinsky, 2001).

Em pacientes com AF e velocidades de fluxo elevadas no DTC, transfusões crônicas e regulares de concentrado de hemácias (entre 21 e 30 dias) reduzem em 90% o risco de ocorrer um primeiro AVC, além de diminuir a taxa hemolítica e o nível de hemoglobina plasmática livre (Lezcano et al., 2006). Entretanto, estudos têm demonstrado que a descontinuidade das transfusões, mesmo após vários anos, pode reverter as velocidades de fluxo cerebrais para valores pré-transfusionais, favorecendo o desenvolvimento do AVC (Steinberg, 2005).

A limitação do DTC em identificar todos os portadores de AF que irão desenvolver um AVC, associada com a dificuldade de comprometimento dos pacientes com programas crônicos de transfusão por tempo indeterminado, expõe a necessidade de marcadores mais sensíveis e específicos para inferir o risco do AVC (Flanagan et al., 2011).

2.3 INFLAMAÇÃO

A adesão de leucócitos ao endotélio vascular e a lesão endotelial subsequente, com produção de citocinas e proteínas de fase aguda, podem apresentar um papel significativo nas crises vaso-oclusivas da AF (Chiang & Frenette, 2005). Além disso, um elevado número de leucócitos é considerado um fator de risco da doença, por ter sido associado com um aumento de morte precoce (Turhan et al., 2002).

No fenômeno vaso-oclusivo, os leucócitos têm atração facilitada pela trombospondina, ligando-se à proteína de adesão CD47 expressa nos eritrócitos falciformes. A vaso-oclusão, então, gera uma cascata que se retroalimenta: gera hipóxia, que gera inflamação, atraindo, assim, mais leucócitos e ativando continuamente o endotélio (que expressam mais moléculas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1, facilitando a adesão dos elementos sanguíneos), tornando assim a AF uma doença inflamatória crônica (Zago e Pinto 2007).

Processos inflamatórios crônicos, seguidos de lesões de isquemia-reperfusão, apresentam um papel fundamental no desenvolvimento de isquemias cerebrais (Marousi et al., 2011). A ativação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem estar relacionadas ao desenvolvimento e evolução do AVC, caracterizando os polimorfismos em genes inflamatórios como possíveis moduladores desse evento clínico (Marousi et al., 2011; Park et al., 2011).

2.3.1 Interleucina 6

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória codificada pelo gene *IL6*, localizado no cromossomo 7 (7p21). É uma citocina multifuncional sintetizada por vários tipos celulares, porém, células endoteliais, fibroblastos e monócitos são os maiores produtores da IL-6 durante inflamações sistêmicas (Heinrich et al., 1990; Ma et al., 2011; Chakraborty et al. 2013). No SNC, sua produção está envolvida na

patogênese de várias desordens neurológicas, como o AVC (Van Wagoner & Benveniste, 1999).

Desde a sua descoberta, a IL-6 demonstrou ter diversas funções biológicas bem caracterizadas, como seu papel como um fator imune e hematopoiético. A IL-6 impulsiona a proliferação e diferenciação de células B em células plasmáticas (Muraguchi et al., 1988), induz a síntese de proteínas de fase aguda Moshage, 1997., e desempenha um papel na maturação e ativação de células T (Takai et al., 1988)

IL-6 age nas células alvo através de um complexo de receptores composto por IL-6, gp130 e IL-6R ou o sIL-6R. Acredita-se que a ativação do receptor requer a formação de um complexo hexamérico composto por duas das proteínas acima mencionadas (Ward et al., 1994). A formação do receptor de IL-6 leva à fosforilação e ativação da gp130 associada a tirosina quinases (JAK quinases). A ativação JAK ainda leva à fosforilação de resíduos de tirosina do STATs (Signal Transducer Activator of Transcription), de uma maneira específica para cada tipo celular. Após a fosforilação, As proteínas STAT dimerizam, translocam para o núcleo e ligam-se a elementos nos promotores da resposta à IL-6 genes (Van Wagoner & Benveniste, 1999).

Recentemente, evidências indicaram que altos níveis séricos de IL-6 estavam associados a um pior prognóstico em pacientes com angina instável, doença miocárdica aguda infarto e acidente vascular cerebral isquêmico. Foi indicado que a IL-6 estava envolvida na aterosclerose, doença cardiovascular, e resposta inflamatória ao AVC. Em condições fisiológicas normais, os níveis de IL-6 no SNC permanecem baixos, no entanto, durante a lesão cerebral e inflamação, os níveis de IL-6 aumentam (Ma et al., 2011).

Estudos demonstraram que alterações nessa citocina, como um polimorfismo na posição -174 (G/C) do gene *IL6* (rs1800795), podem influenciar o desenvolvimento do AVC, com o alelo G sendo responsável por uma maior atividade da IL-6 do que o alelo C (Ma et al., 2011; Chakraborty et al. 2013). Além disso, esse polimorfismo está associado com a extensão do AVC isquêmico em pacientes jovens, com o alelo G sendo um fator de risco para essa condição (Fishman et al., 1998; Greisenegger et al., 2003; Flex et al., 2004).

2.4 ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES

A úlcera de membros inferiores é a complicação cutânea mais frequente na doença falciforme, atingindo principalmente a região dos maléolos medial e lateral e a região frontal da perna e calcanhares, e ocorre devido a vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos, apresentando cicatrização lenta e alta taxa de recorrência (Serjeant et al., 2005; Paladino, 2007; Bowers, 2013; Alavi and Kirsner, 2015). Ocorre entre 8% a 10% dos pacientes falciformes, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A variabilidade é determinada por diferenças genéticas e condições ambientais e é predominante no sexo masculino acima dos 10 anos de idade (Steinberg, 2008).

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

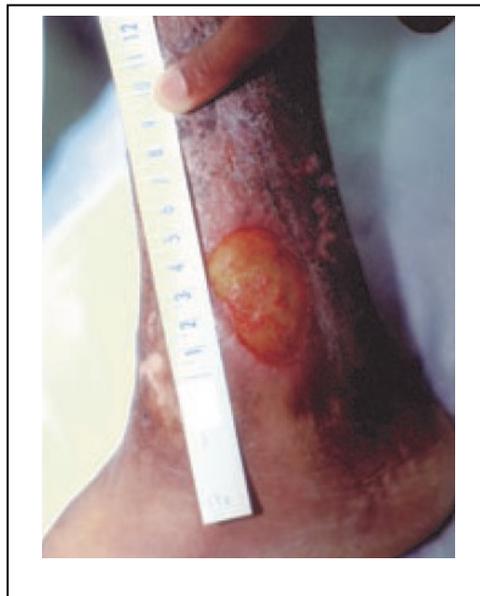


Figura 7: Fotografia representativa da úlcera de membros inferiores, com comprometimento do maléolo medial direito (McMahon, et al 2010).

2.4.1 Classificação

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

- Fase 1: Eritema com pele intacta, em que se anuncia a ulceração da pele com sintomas, tais como, descoloração da pele, calor, edema, endurecimento da região;
- Fase 2: Perda parcial dos componentes da pele com envolvimento principal da epiderme e derme;
- Fase 3: Comprometimento de todas as camadas da pele chegando a necrose do tecido subcutâneo, em que a úlcera, normalmente, se apresenta sob a forma de cratera;
- Fase 4: Perda completa da espessura da pele com destruição extendendo-se até o músculo, ossos ou estruturas de suporte, como tendões, em que há necrose tecidual.



Figura 8 – Imagens de úlceras maleolares de pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope.

Fonte: Fotos cedidas pelo LabGen.

De acordo com sua duração, as úlceras podem ser classificadas em agudas ou crônicas. Entretanto não há uma definição consensual que defina um período específico para a cronicidade, aceitando-se, de modo geral, aguda quando há cicatrização em menos de um mês, e crônica com duração acima de 2 meses, não sendo rara a permanência desta por vários anos em fenômeno contínuo de cicatrização e reabertura (Minitti et al., 2010, Umeh; 2017).

As úlceras espontâneas surgem em áreas da derme que sofrem sucessivos quadros de hipóxia tecidual e danos ao endotélio. Crises hemolíticas provocam diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico e vaso-oclusões recorrentes resultam em infarto tecidual e necrose, além das infecções bacterianas. Com o avanço do processo inflamatório, há degradação da derme e a úlcera se instala. Sem o tratamento devido, a capacidade de cicatrização da pele é afetada, e a lesão torna-se crônica (Ladizinski et al., 2012).

Com o objetivo de esclarecer a fisiopatologia da microcirculação e as características histopatológicas dessas lesões, Minitti e colaboradores (2013) realizaram um estudo com 18 pacientes com anemia falciforme que apresentaram úlceras ativas. Foram utilizadas técnicas de captura de imagem a laser, para acompanhamento da microcirculação, e biópsias para estudo histológico.

A biópsia foi realizada em úlceras ativas com até quatro semanas de duração, livres de infecção. Os achados mostraram que a base da UM é formada por tecido de granulação com infiltrado inflamatório crônico e regiões com processo inicial de cicatrização e espessamento do endotélio. Mudanças epidérmicas com deposição de queratina e fibrina em excesso, ocasionando compressão do lúmen de pequenos vasos e conseqüente estase sanguínea. Há um processo intenso de neovascularização com espessamento da parede dos novos capilares e vênulas, com estase sanguínea e vaso-oclusão decorrente da ausência de flexibilidade dos eritrócitos falcizados (Minitti et al., 2013).

2.4.2 Tratamento e Prevenção

O tratamento das úlceras consiste, sumariamente, dos cuidados com as feridas abertas, sendo feito, basicamente, com uso de curativos secos. Com o tratamento adequado as úlceras podem cicatrizar em poucos meses, entretanto,

úlceras mais extensas e com mais tempo de abertas podem requerer maiores cuidados exigindo terapias auxiliares, tais como, enxerto de pele, uso de botas, aplicação tópica de Burtirato de Arginina ou Sulfato de Zinco (Delaney et al., 2013).

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

Observações clínicas e estudos epidemiológicos documentam o papel central do trauma no aparecimento das úlceras. Este fato proporciona uma série de intervenções simples que permitem reduzir a prevalência desta manifestação, como, por exemplo, a utilização de artefatos portadores para a região comumente afetada (Minitti et al., 2011).

Um fator importante, é fato de que as condições sócio econômicas tem um importante efeito sobre a frequência e extensão das úlceras, de modo que uma melhor qualidade de vida influenciará as consequências desse fenômeno (Connor, 2017).

2.4.3 Fatores Genéticos nas Úlceras maleolares

A recorrência das úlceras é frequente, e o processo de cicatrização é lento e ainda não há tratamentos definitivos (Umeh et. al, 2017). Os motivos pelos quais elas surgem espontaneamente e porque se tornam crônicas, vem sendo esclarecidos por estudos que avaliam disfunções nas vias de ativação dos genes envolvidos nos mecanismos de reparo. Variantes genéticas que descontrolam estas vias podem ser responsáveis pela cronicidade do processo. A principal via participante na recuperação de lesões, é a via do fator transformador do crescimento β (TGF- β) (Jude et al., 2001).

Estudos recentes investigam o papel dos genes com função na modulação de respostas inflamatórias. Realizando estudos de associação de polimorfismos de base única, Nolan e colaboradores (2006) verificaram o envolvimento de polimorfismos na via de ativação do gene *TGF- β* (do inglês, *transforming growth factor β*) no desenvolvimento de úlcera de perna em portadores da doença falciforme. Assim como Fertrin e Costa (2010), também baseados no mesmo

princípio, relataram em um artigo de revisão o envolvimento da via do TGF- β com as principais manifestações clínicas na AF, ressaltando seu papel na ocorrência da UM (Fertrin & Costa, 2010).

2.5 FATOR TRANSFORMADOR DO CRESCIMENTO (TGF-B)

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica que atua como um potente inibidor do crescimento de uma ampla variedade de células, incluindo células epiteliais, células endoteliais vasculares, células hematopoiéticas e linfócitos (Roberts & Sporn, 1990; Miyazono et al., 1994; Blobe et al., 2000, Ligi et. al., 2017). Atua também no curso patológico de úlceras gástricas e de pele, regula o processo de cicatrização, reepitelização, inflamação local e formação de granulação do tecido (Tanigawa et al., 2005; Pastar et al., 2010). É uma citocina multifuncional com fortes efeitos sobre o sistema imunológico, sendo secretada por diversos tipos celulares: células T, fibroblastos, células epiteliais e plaquetas (Lawrence, 1995).

Alterações das vias de sinalização de TGF- β resultam na perda da regulação do crescimento celular, que é uma das etapas cruciais na oncogênese. O TGF- β é também um potente indutor de fibrose do tecido, o qual pode fornecer um microambiente adequado para o crescimento de células em transformação (Miyazono, 2001).

O mecanismo pelo qual essas funções ocorrem, é dependente de interação do TGF- β com receptores na superfície celular, que desencadeará a ativação de diferentes vias de sinalização e regulação da homeostase em praticamente todos os tecidos do organismo. Somente a molécula ativa é capaz de se ligar ao seu receptor, e este mecanismo representa um sistema típico de interação ligante-receptor, seguido de transdução de sinal e culminando em um efeito biológico (Massangué, 1998; Shi & Massangué, 2003).

Existem três isoformas de TGF- β que são codificados por genes distintos: TGF- β 1, localizado no cromossomo 19q13.1, TGF- β 2 (1q41) e TGF- β 3 no cromossomo 14q24 com estruturas e atividades biológicas similares (Roberts & Sporn, 1990). Muitas outras proteínas também têm estruturas essencialmente similares ao TGF- β e são coletivamente incluídas na superfamília TGF- β , que inclui mais de 30 proteínas, entre elas as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Massangué, 1998; Kawabata & Miyazono, 2000).

Os diversos efeitos dos tipos do TGF- β , são mediados de acordo com o tipo de receptor específico localizado na membrana celular, sendo três respectivamente: TGF- β R1, TGF- β R2 e o tipo TGF- β R3. O desequilíbrio na produção do TGF- β está implicado no surgimento de câncer, doenças com distúrbios fibróticos e processos inflamatórios (Massagé, 1998; Liu & Pravia, 2010; Poniatowski et al, 2015).

2.5.2 Via de Sinalização do TGF- β

O TGF- β 1 é secretado sob a forma de um complexo latente, o qual é incapaz de interagir com seu receptor, portanto é biologicamente inativo. Ao ser clivado, esse complexo libera TGF- β 1 como uma proteína homodimérica ativa de 25 kDa, com sub-unidades de 112 aminoácidos (Massagué, 1998).

A via de transdução do sinal do TGF- β inicia-se com a ligação do peptídeo TGF- β ao receptor tipo II específico (TGFRII) o qual fosforila e ativa o receptor tipo I (TGFRI). Estes receptores são moléculas transmembranares com domínio de serina/treonina cinase (Massangué, 1998). O receptor tipo III (TGFRIII), conhecido como betaglicana, é o tipo mais abundante e eles funcionam ligando TGF- β e depois o transferindo para seus receptores de sinalização, os receptores de tipo I e II, dessa forma facilitando o acesso da citocina aos receptores do tipo I e II (Ramirez et al., 2013).

Uma vez o TGF- β ligado aos receptores, ocorrerá a formação de um complexo heterotetramérico, com exposição de sítios específicos para ligação com proteínas SMADs (figura 9). O TGFRI propaga a sinalização através da ativação e fosforilação de proteínas citoplasmáticas da família de R-SMADs (conhecidas como SMADs regulatórias tipo 2 e 3) em sítio conhecidos como SSXS da porção C-terminal que é conservado em todas as R-SMADs (Laurence, 1995; Massangué, 1998).

Quando fosforiladas as proteínas R-SMAD2 e R-SMAD3 permitem a formação de homodímeros (pSMAD2/2 ou pSMAD3/3) ou heterodímeros (pSMAD2/3). A transdução do sinal é mediada por uma proteína SMAD co-estimulatória (Co-SMAD), a SMAD 4. Forma-se então um complexo da SMAD 4 com as SMADs 2 e 3, que é translocado para o núcleo onde irá controlar a transcrição de genes alvos (Massangué, 1998).

Entretanto, esta via necessita de regulação inibitória, sendo exercida por uma SMAD inibitória, a SMAD7, que impede a fosforilação de R-SMADs e interfere na formação do complexo R-SMAD com a Co-SMAD (Attisano & Wrana, 1998; Shi & Massagué, 2003; Rubtsov & Rudensky, 2007).

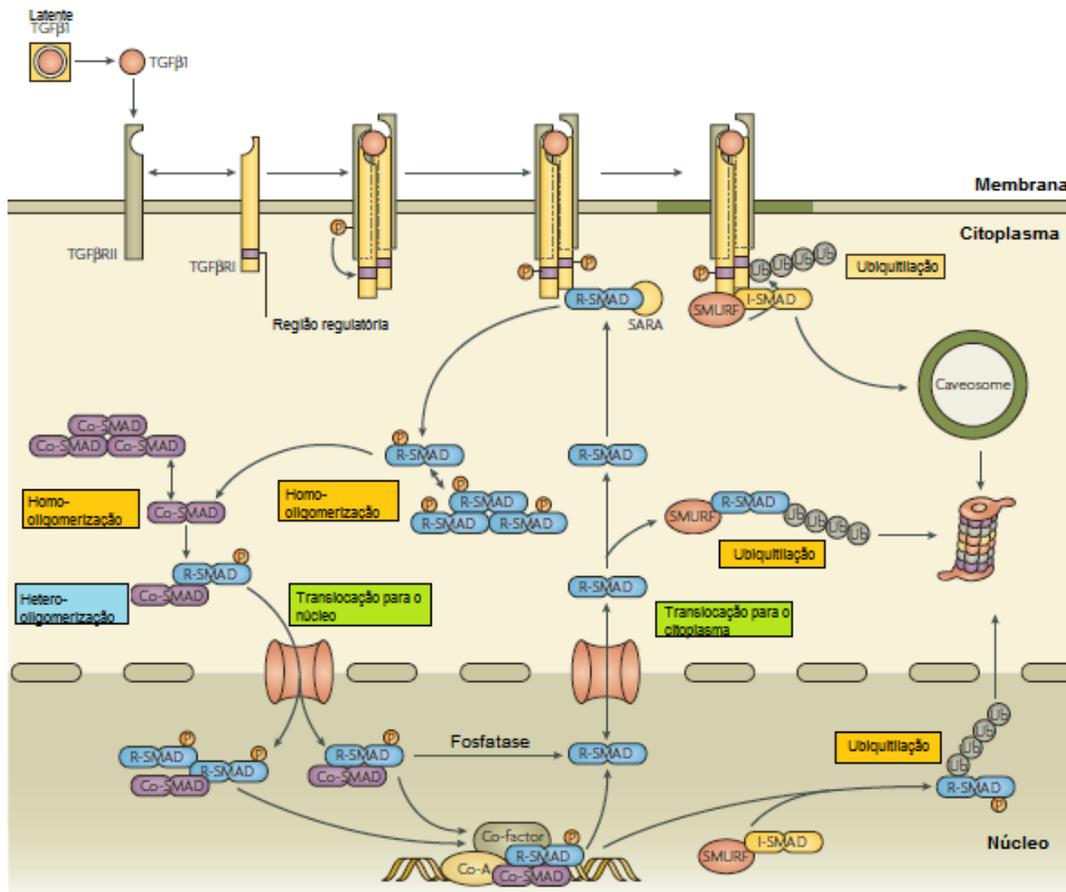


Figura 9 – Desenho esquemático ilustrando a via de sinalização do TGF- β . Transdução de sinal superfamília TGF- β /BMP. Ligantes do TGF- β , se ligam a receptores do tipo II, que, em seguida recrutam os receptores do tipo I levando a transfosforilação de receptores tipo I. Receptor tipo I ativado fosforila RSmad 2/3, que, em seguida, com o complexo de Smad4, translocam-se para o núcleo onde irão se ligar a regiões específicas no DNA, co-estimuladores ou co-repressores de genes alvo. Esta via é inibida pela I-Smad7 no núcleo, e SMURF1 no citoplasma (Adaptado de Rubtsov & Rudensky, 2007).

SMADs possuem estruturas peculiares, que lhes confere funções diferentes. São constituídas por domínios conservados, amino-terminal (MH1) e carboxi-terminal (MH2), e um domínio central pouco conservado que conecta domínios MH1 e MH2. O domínio MH1 confere às SMADs capacidade de associação com o DNA e interação com fatores de transcrição, enquanto MH2 é importante para formação do

complexo SMAD-receptor e confere atividade transcricional. Embora SMAD2 e SMAD3 compartilhem alta homologia e ambas sejam capazes de responder ao estímulo gerado pelo complexo TGF- β /receptor ou activina/receptor, existem diferenças funcionais entre as R-SMADs, que poderiam ser explicadas em parte pela capacidade de a SMAD3 se ligar ao DNA, enquanto a SMAD2 apresenta um inserto em seu domínio MH1 que impede sua interação com o DNA (Massangué, 1998; Wrington et al., 2009).

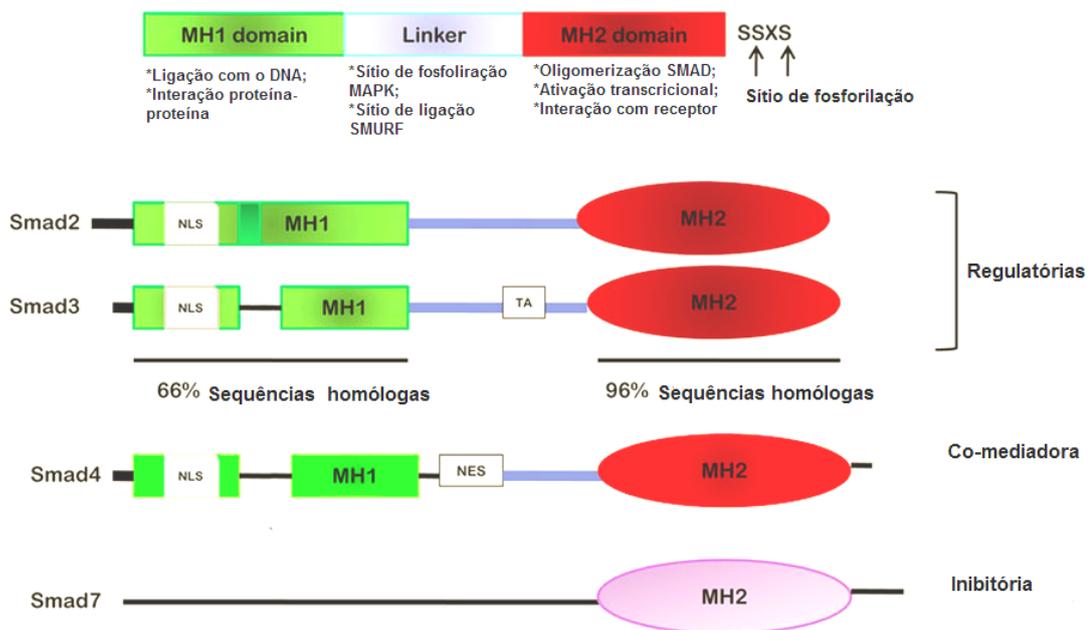


Figura 10 – Domínios estruturais das SMADs. Os domínios MH1 da SMAD2 possui uma sequência adicional de 30 aminoácidos, conferindo 66% de homologia com SMAD3. Esta por sua vez, contém na porção *Linker* uma região de trans-ativação (TA) de ligação com MAPK. Enquanto que a SMAD4, apresenta na porção *Linker* um ponto de sinalização de exportação do núcleo. Comumente, as SMADs possuem *NLS* um sinalizador nuclear, com função de importar o complexo para o núcleo da célula. Em contra-partida, a I-SMAD7, apresenta apenas o domínio MH2, como sendo controlador da fosforilação (Adaptado de Samanta & Datta, 2012).

2.5.3 Regulação negativa da via de sinalização do TGF- β

Além das SMADs envolvidas na transdução da sinalização intracelular dos ligantes da família TGF- β ao núcleo, denominados SMADs regulatórias, a via de sinalização de TGF- β é regulada pelo SMAD7, classificada como SMAD inibitória (I-SMAD), que são induzidas pela sinalização por SMAD, acumuladas no núcleo e podem ser então exportadas após estímulo via TGF- β . A SMAD7 bloqueia a fosforilação dos R-SMADs, interferindo na fosforilação de SMAD2/3 pelo receptor tipo I e na formação do complexo R-SMAD/ Co-SMAD. A transcrição de SMAD7 é

induzida por TGF- β e mediada pela ligação de SMAD3 e SMAD4 na região promotora do SMAD7, este complexo estimula então a desfosforilação do receptor pelo recrutamento de fosfatases, representando um mecanismo auto regulatório da via de sinalização TGF- β , a nível do citoplasma (Massagué, 1998; Xu et al., 2012).

Outra via auto regulatória também controla a formação do complexo no núcleo, ativada pelas SMURFs, (do inglês *SMAD ubiquitination regulatory factor*) (Massagué, 1998). As SMURFs são enzimas que regulam a degradação de componentes da via de sinalização de TGF- β pelo sistema de proteólise dependente de ubiquitinação. A ubiquitinação das proteínas vem sendo reconhecida como um importante processo de regulação celular. A ligação da proteína-alvo à ubiquitina requer a ação sequencial das enzimas E1, E2 e E3 ligases, sendo que a capacidade de E3 reconhecer a proteína-alvo confere uma alta especificidade ao sistema ubiquitina-proteossoma (Ebisawa et al., 2001; Suzuki et al., 2002).

2.5.4 Papel biológico do TGF- β

O TGF- β tem como principal função a de fator de crescimento onde atua em diferentes respostas biológicas, desempenhando atividades proliferativas e anti-proliferativas, sendo capaz tanto de inibir como de estimular o crescimento de um mesmo tipo celular, dependendo do microambiente em que a célula está exposta (Massagué, 2000; Massagué & Xi, 2012; Chen et al., 2012).

Além da ação na proliferação celular, o TGF- β é uma das principais citocinas envolvidas na regulação da formação e degradação da matriz extracelular, induzindo a expressão de fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina e trombospondina. Componentes essenciais nos mecanismos de manutenção da homeostase tecidual, principalmente nas úlceras de membros inferiores (Jude et al., 2001; Kim Byung-Chul et al., 2003; Ramirez et al., 2013).

O TGF- β é comumente classificado como uma citocina anti-inflamatória, de resposta Th-2, reguladora do sistema imunológico. Os mecanismos coordenados pelas vias de sinalização incluem: a) supressão da diferenciação de células T efetoras; b) conversão de células T *naïve* em células T regulatórias; c) inibição da produção de citocinas efetoras, tais como IL-2, IL-4, Interferon gama (IFN- γ) e TNF-

alfa e; d) supressão da atividade de macrófagos, células dendríticas e células NK (Rubtsov & Rudensky, 2007).

A supressão da ativação de macrófagos inibe a produção do NO. Essa inibição também sofre influência do TGF- β que tem a capacidade de estimular a atividade da arginase, que é um inibidor competitivo da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). A produção de NO está relacionada a importantes processos fisiológicos e patológicos, incluindo a destruição de microrganismos infecciosos, e a regulação de metaloproteinases de matriz extracelular (Adewoye et al., 2006; Weiss & Attisano, 2013).

Alterações nas vias de sinalização do TGF- β estão relacionadas com crescimento celular desordenado, como a proliferação de células cancerígenas, por exemplo, com perda de resposta inibidora do crescimento celular. Ao contrário disso, um aumento na atividade de TGF- β desempenha papel central na fibrose (Awad et al., 1998; Scollen et al., 2011).

Nos processos de reparo tecidual, o TGF- β é a principal citocina a ser ativada e responsável por manter a homeostase local. O mecanismo de reparação é um evento que começa imediatamente depois do ferimento, figura 11. Envolve, principalmente, inflamação caracterizada por eventos vasculares e celulares (Werner & Grose, 2003; Ramirez et al., 2013).

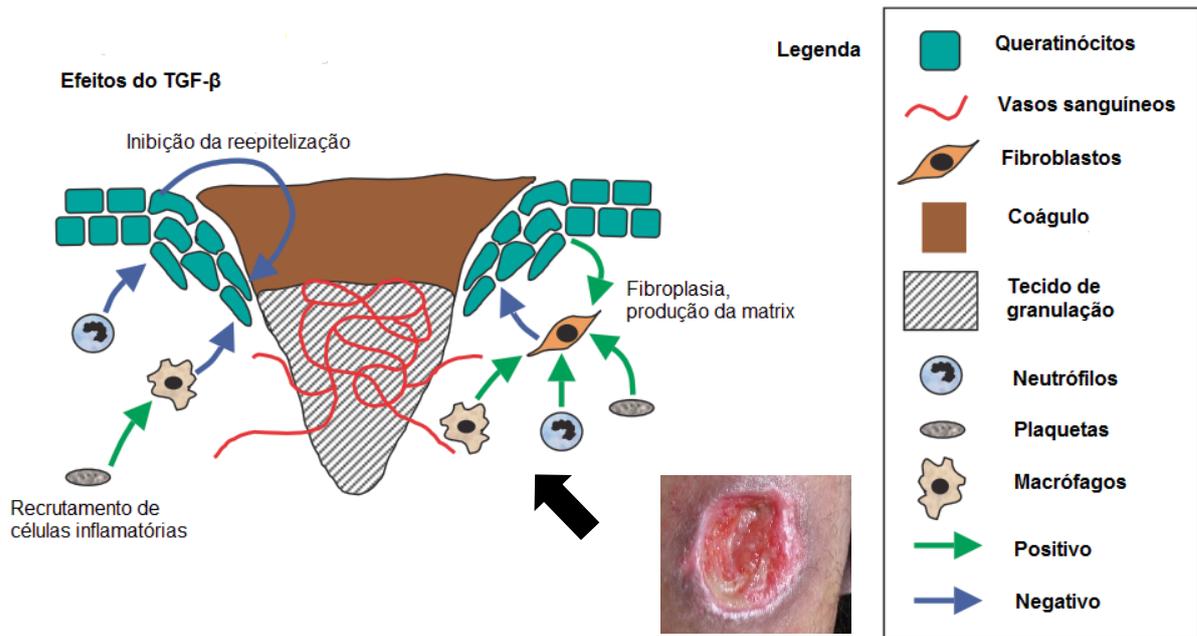


Figura 11 – Funções do TGF- β na cicatrização de lesões teciduais (Adaptado de Werner & Grose, 2003).

Depois de instalada a lesão tecidual, há formação de coágulo, deposição de fibronectina, reepitelização, neovascularização e fibroplasia. Tanto em feridas bucais quanto em feridas de pele estão envolvidos múltiplos tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais), mediadores solúveis (fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas), insolúveis (componentes da matriz extracelular) numa sequência de eventos que compreende 3 fases: inflamação, proliferação (especialmente fibroblastos) e remodelação (Werner & Grose, 2003; Kim Byung-Chul et al., 2003). Nos pacientes com anemia falciforme, a ocorrência de vaso-oclusões subsequentes à formação das hemácias falcizadas, compromete o fluxo sanguíneo local, conduzindo a hipóxia tecidual local resultando em úlceras de perna (Minniti et al., 2010).

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

Diante da compreensão das funções do TGF- β , estratégias terapêuticas para acelerar a recomposição dérmica em lesões e inibir a proliferação celular em

patologias cancerígenas, vêm sendo estudadas como formas de melhorar tratamentos médicos (Arno et al., 2014).

2.6 VARIÁVEIS GENÉTICAS NO ESTUDO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ANEMIA FALCIFORME

Os estudos de associações de polimorfismos genéticos vêm ganhando um valor crucial no que concerne ao entendimento da variabilidade fenotípica da anemia falciforme, uma vez que interações das modificações genéticas com o ambiente em que o indivíduo vive, pode responder a alguns questionamentos a respeito da variabilidade do fenótipo (Bhatnagar et al., 2013; Galarneau et al., 2013; Mtatiro et al., 2014).

Polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles. Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo, e <1% considera-se mutação (Collins et al., 1998)

Descobrir um SNP associado poderia significar a causa direta do desenvolvimento de certa doença, mas alternativamente, pode significar apenas uma ligação genética ao SNP causal. Portanto, uma investigação mais aprofundada e um mapeamento fino das áreas em torno de SNPs associados, como análise da expressão de genes alvo geralmente são necessários (Balding, 2006; Lunetta, 2008). Diante deste contexto, vários estudos investigam como e quais variações genéticas podem estar sendo responsáveis pela diversidade fenotípica na anemia falciforme. A explicação para questionamentos como: por que alguns pacientes desenvolvem úlceras de perna, sem causa prévia, AVC e outros não? Por que uns convivem longos anos com a ferida aberta, enquanto em outros elas logo cicatrizam? Ou até mesmo por que de alguns pacientes, desde muito jovens já conviverem com alto risco de desenvolverem AVC. Essas questões podem começar a ser esclarecidas a partir de estudos com SNPs em genes de vias específicas da inflamação e cicatrização e sabendo das complicações clínicas, dos riscos de morte que o AVC traz para esses pacientes principalmente na infância, e de como a

qualidade de vida desses pacientes é bastante afetada na fase adulta pelas UMs, levando à complicações graves como a amputação do membro, é muito importante encontrar marcadores que possam prever essas condições (Nolan et al., 2006; Bandeira et al., 2014),.

3 INTERLEUKIN-6 G-174C POLYMORPHISM PREDICTS HIGHER RISK OF STROKE IN SICKLE CELL ANAEMIA

Artigo publicado na revista "British Journal of Haematology" - Fator de Impacto: 5.128 ; Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: A1

RED CELLS and IRON

Interleukin-6 G-174C polymorphism predicts higher risk of stroke in sickle cell anaemia

Igor F Domingos¹, Diego A Pereira-Martins¹, Juan L Coelho-Silva¹, Rayssa L Borges-Medeiros¹, Diego A Falcão¹, Renata C Azevedo², Ana C Anjos², Fernando F Costa³, Taciana F Mendonça⁴, Maria S Cavalcanti⁴, Aderson S Araujo², Antonio R Lucena-Araujo^{1*}, Marcos A Bezerra¹

Affiliations: ¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ² Department of Internal Medicine, Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil; ³ Haematology and Haemotherapy Centre, University of Campinas, São Paulo, Brazil; ⁴ Department of Medical Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil.

* **Corresponding author:** Antonio R Lucena-Araujo. Department of Genetics, Centre of Biological Sciences. Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil. Tel: +55-81-2126-7825. Fax: +55-81-2126-7825. E-mail: araujoarl@hotmail.com

Running title: *IL6 G-174C* impact in stroke development in SCA

Text count: 1,003 words.

Number of tables: 1 table.

Number of figures: 1 figure.

Number of references: 8 references.

Supplemental file: 1 file

Number of manuscript pages: 9 pages.

It is clear that specific genetic variants may contribute to the development of cerebrovascular disease in sickle cell anaemia (SCA) (Flanagan *et al*, 2013). In addition, emerging data suggest that the brain may exhibit key features of inflammation (Russo & McGavern, 2015), particularly due to higher levels of the IL-6 cytokine (Lucas *et al*, 2006). Here, we retrospectively aim to deduce the prognostic relevance of *IL6* G-174C polymorphism, and its association with cerebrovascular disease in haemoglobin SS-genotyped patients.

Between March 2013 to July 2016, 316 peripheral blood from haemoglobin SS-genotyped patients were collected. Patients were followed from birth until September 2016 in a single reference centre in northeast Brazil. Ethical approval was obtained from the local Research Ethics Board and, in accordance with the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients, or, when applicable, from their parents, prior to study commencement. The median age of our cohort was 12 years (range: 2-27 years), with 147 males (46%). Eighty-nine patients (28%) were older than 18 years. All patients had completed transcranial Doppler (TCD) ultrasonography during childhood, and were regularly followed by a neurologist, following standard recommendations (Adams *et al*, 1998). According to the time-averaged mean of the maximum velocity in TCD screening (Adams *et al*, 1998), patients were stratified as follows: normal TCD (198 patients, 63%), conditional TCD (63 patients, 20%), and high-risk TCD (46 patients, 14%). Patients who presented with an inadequate TCD analysis (i.e., TCD not interpretable), were excluded from our analyses (nine patients; 3%). Important, patients must have undergone to two consecutive TCD studies to enter the study. Ischemic stroke (hereafter called stroke) was defined as a regional loss of cerebral blood flow due to stenotic or occluded cerebral vasculature, as subsequently confirmed by imaging exams. Patient follow-up was last updated in October 2016. At this point, patients with no history of clinical stroke had no evidence of silent infarcts or transient ischemic attack, based on their baseline brain magnetic resonance imaging (performed after the first decade of life). The treatment protocol was adapted following the multicentre STOP trials criteria (Adams *et al*, 1998). Briefly, all patients with high-risk TCD were treated with regular blood transfusions, with or without hydroxycarbamide (19/46; 41%). Patients with conditional TCD were monitored quarterly, and 51/63 (81%) were treated with hydroxycarbamide. Patients with normal

TCD were monitored annually, with clinical intervention (i.e., use of hydroxycarbamide after TCD screening analysis, 69/198; 35%), based on others clinical complications not related to cerebrovascular disease. Following DNA extraction, *IL6* G-174C (rs1800795) polymorphisms was detected by real-time PCR using the SNP genotyping assay (C__1839697_20, Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), according to the manufacturer's instructions. Details can be found in Supplemental data.

Of the 307 patients, 26 (8.5%) had stroke. The median time for stroke after TCD screening was 19 months (range: 1-87 months). According to TCD criteria velocities, 6% (12/198), 6% (4/63), and 22% (10/46) of patients assigned to the normal, conditional, and high-risk TCD groups experienced stroke ($P=0.002$), respectively. The entire cohort was characterized for the *IL6* G-174C polymorphism: 196/307 patients (64%) carried the *IL6* GG genotype, while 103/307 (34%), and 8/307 (2%) presented with the GC and CC genotypes, respectively. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was detected ($P>0.05$). The frequency of stroke was significantly lower in patients with *IL6* GG (6%), compared to patients with the GC (11%), or CC (50%) genotypes ($P<0.001$). The prognostic impact of the *IL6* G-174C polymorphism for each TCD group revealed that the *IL6* GG genotype retained its significant association with a lower risk of stroke in normal ($P=0.005$), and conditional ($P<0.001$) TCD groups, but had no impact for the high-risk TCD group ($P=0.437$). With a median follow-up of 10 years (range: 2–27 years), the estimated 10-year stroke rate of 7% (95% confidence interval, CI: 4-12%). Patients with the *IL6* GG genotype had almost 3-fold lower risk of stroke (odds ratio, OR: 0.38, 95% CI: 0.16-0.86; $P=0.02$), albeit these data were not consistent with multivariate logistic regression analysis (OR: 0.64, 95% CI: 0.11-3.55; $P=0.592$) (Table 1). In agreement, the cumulative incidence of stroke was significantly lower for patients with the *IL6* GG genotype (4%, 95% CI: 1-9%), compared to patients with either the *IL6* GC (11%, 95% CI: 6-20%), or *IL6* CC genotypes (42%, 95% CI: 16-82%) ($P<0.001$; Figure 1), but *IL6* GG genotype did not retain its prognostic value in multivariate proportional hazards regression analyses (hazard ratio: 0.69, 95% CI: 0.17-2.74; $P=0.602$) (Table 1).

Some evidence suggest that the IL-6 serum levels may be altered by the *IL6* G-174C CC genotype (Brull *et al*, 2001;Burzotta *et al*, 2001;Kilpinen *et al*, 2001).

Such regulatory effect could underlie the adverse outcomes predicted for the *IL6* G-174C polymorphism in stroke development, not only in the general population (Chakraborty *et al*, 2013), but also for patients with SCA. More important, our data suggest that patients with normal and conditional TCD could benefit through molecular markers (as *IL6* G-174C polymorphism), in order to add their predictive value to TCD screening. It is important to note that the STOP trials recommend that patients with normal and conditional TCD should be monitored annually and quarterly, respectively; meanwhile, those patients could develop stroke. We support the idea that improvements for primary stroke prevention are necessary, in particular for patients with older age. Such initiatives could be achieved integrating genetic prognostic variations with the recommendations from the multicentre STOP trial (Adams *et al*, 1998), in order to provide a risk-adjusted therapy predicted to improve patient outcomes.

Although we have demonstrated that the *IL6* G-174C polymorphism is associated with a risk of stroke in patients with SCA, our data must be taken with caution. Most of patients are under 18 years of age, and we may not rule out the chance of stroke after the second decade of life. In addition, 35% of patients with normal TCD were treated with hydroxycarbamide due to others complications not related to stroke, and such intervention may overlap to genetics findings and underestimate our results. Finally, validations in independent cohorts could significantly strengthen our findings.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge all subjects and their parents for their cooperation in this study. This work was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Grant #483714/2013-5).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

I.F.D. performed experiments, analyzed and interpreted data, and drafted the manuscript. D.A.P-M., J.L.C-S., R.L.B-M., D.A.F., T.F.M., and M.S.C. performed experiments, updated the clinical data and reviewed the manuscript. R.C.A. performed TCD measurements, and reviewed the manuscript. F.F.C., A.C.A. and A.S.A. recruited patients, updated the clinical data, and reviewed the manuscript. A.R.L-A. analyzed and interpreted data, performed statistical analyses, and drafted the manuscript. A.R.L-A. and M.A.B. conceived and designed the study, reviewed the manuscript. A.R.L-A. gave the final approval of the version to be submitted.

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no competing financial interests to declare.

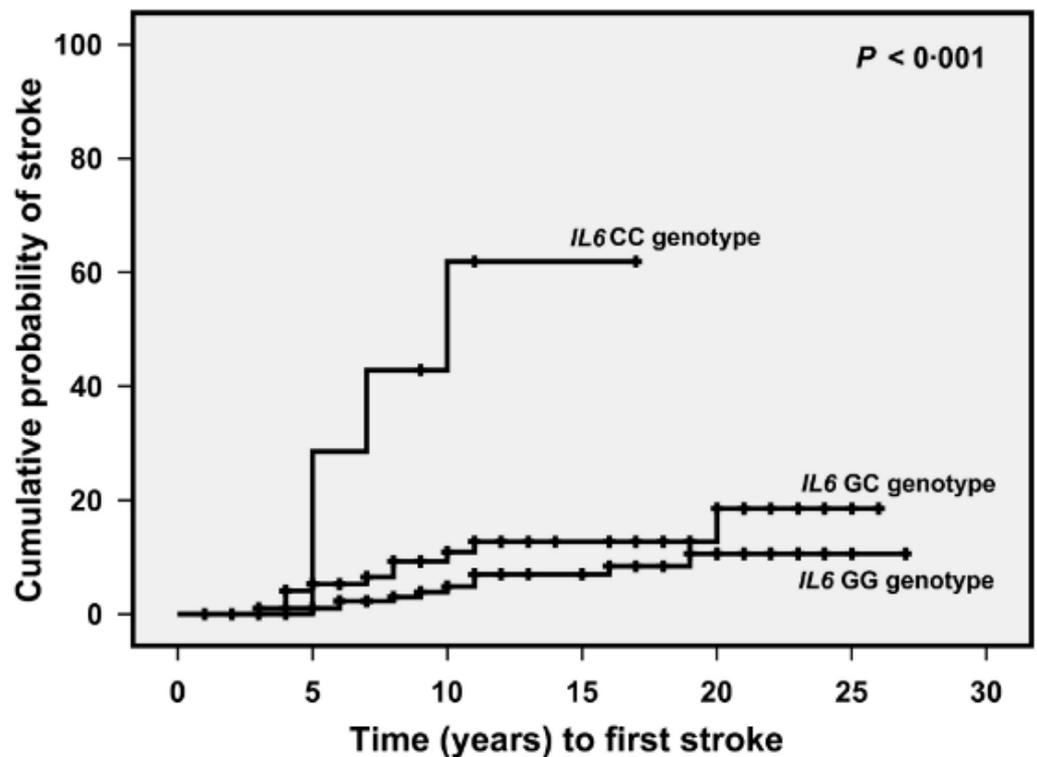
REFERENCES

- Adams,R.J., McKie,V.C., Hsu,L., Files,B., Vichinsky,E., Pegelow,C., Abboud,M., Gallagher,D., Kutlar,A., Nichols,F.T., Bonds,D.R., & Brambilla,D. (1998) Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N.Engl.J.Med.*, **339**, 5-11.
- Brull,D.J., Montgomery,H.E., Sanders,J., Dhamrait,S., Luong,L., Rumley,A., Lowe,G.D., & Humphries,S.E. (2001) Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, **21**, 1458-1463.
- Burzotta,F., Iacoviello,L., Di,C.A., Gliuca,F., Luciani,N., Zamparelli,R., Schiavello,R., Donati,M.B., Maseri,A., Possati,G., & Andreotti,F. (2001) Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am.J.Cardiol.*, **88**, 1125-1128.
- Chakraborty,B., Chowdhury,D., Vishnoi,G., Goswami,B., Kishore,J., & Agarwal,S. (2013) Interleukin-6 gene -174 G/C promoter polymorphism predicts severity and outcome in acute ischemic stroke patients from north India. *J.Stroke Cerebrovasc.Dis.*, **22**, 683-689.
- Flanagan,J.M., Sheehan,V., Linder,H., Howard,T.A., Wang,Y.D., Hoppe,C.C., Aygun,B., Adams,R.J., Neale,G.A., & Ware,R.E. (2013) Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood*, **121**, 3237-3245.
- Kilpinen,S., Hulkkonen,J., Wang,X.Y., & Hurme,M. (2001) The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. *Eur.Cytokine Netw.*, **12**, 62-68.
- Lucas,S.M., Rothwell,N.J., & Gibson,R.M. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br.J.Pharmacol.*, **147 Suppl 1**, S232-S240.

Russo, M.V. & McGavern, D.B. (2015) Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends Immunol.*, **36**, 637-650.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Cumulative incidence curve. Cumulative incidence of stroke in patients with SCA, according to the *IL6* G-174C (rs1800795) genotype. For *IL6* GG genotyped patients, the median follow-up was 10 years (range; 3 to 27 years), whereas the mean follow-up for *IL6* GC and GG genotyped patients were 11 years (range: 2 to 26 years) and 9 years (range: 4 to 18 years), respectively.



Number of patients at risk:

<i>IL6</i> GG genotype	196	180	98	70	35	3	0
<i>IL6</i> GC genotype	103	85	54	36	16	3	0
<i>IL6</i> CC genotype	8	7	3	1	0	0	0

Table 1. Univariate and multivariate analyses.

End point	Model variables	Univariate analysis				Multivariate analysis			
		OR	HR	95% CI	P-value	OR	HR	95% CI	P-value
Risk of stroke	<i>IL6</i> genotype: GG genotype vs GG+GC genotypes	0.38		0.16 0.86	0.02	0.64		0.11 3.55	0.592
	TCD: normal vs conditional vs higher-risk	2.02		1.25 3.26	0.004	0.46		0.05 4.21	0.175
	Therapy after TCD: hydroxycarbamide vs blood transfusion	0.12		0.03 0.38	< 0.001	0.06		0.01 3.73	0.849
	Gender: male vs female	0.99		0.99 2.22	0.991	0.89		0.17 4.59	0.703
	Leukocyte count ($\times 10^9/L$): continuous variable	1.03		0.99 1.11	0.433	1.06		0.99 1.29	0.646
	Haemoglobin levels (g/L): continuous variable	0.85		0.56 1.31	0.486	1.01		0.36 2.81	0.714
	Foetal haemoglobin levels (%): continuous variable	0.88		0.76 0.96	0.013	0.91		0.73 1.13	0.142
	Lactate dehydrogenase: continuous variable	1.11		1.09 1.19	0.017	1.07		0.99 1.2	0.31
Cumulative incidence of stroke	<i>IL6</i> genotype: GG genotype vs GG+GC genotypes		0.4	0.18 0.87	0.021		0.69	0.17 2.74	0.602
	TCD: normal vs conditional vs higher-risk		1.92	1.23 2.99	0.004		0.51	0.06 4.08	0.528
	Therapy after TCD: hydroxycarbamide vs blood transfusion		0.15	0.05 0.44	0.001		0.7	0.17 3.48	0.188
	Gender: male vs female		1.06	0.49 2.3	0.869		1.2	0.3 4.67	0.791
	Leukocyte count ($\times 10^9/L$): continuous variable		1.04	0.99 1.11	0.261		1.07	0.99 1.27	0.471
	Haemoglobin levels (g/L): continuous variable		0.87	0.58 1.32	0.534		1.05	0.44 2.51	0.901
	Foetal haemoglobin levels (%): continuous variable		0.86	0.77 0.97	0.018		0.88	0.71 1.09	0.264
	Lactate dehydrogenase: continuous variable		1.09	1.01 1.16	0.024		1.03	0.99 1.17	0.651

NOTE: Odds ratios (OR) or hazard ratio (HR) > 1 or < 1 indicate an increased or decreased risk, respectively, of an event for the first category listed.

4 ASSOCIATION OF TGF-B PATHWAY POLYMORPHISMS WITH DEVELOPMENT OF LEG ULCERS IN SICKLE CELL ANEMIA

Artigo a ser submetido na revista "Blood" - Fator de Impacto: **13.164**; Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: A1

Association of TGF- β pathway polymorphisms with development of leg ulcers in sickle cell anemia

Diego A Falcão¹, Luana L Prado¹, Isabela C Farias¹, Igor F Domingos¹, Diego A Pereira-Martins¹, Marina Cadena⁶, Taciana F Mendonça², Luydson V Silva², Maria S Cavalcanti³, Kleber Y Fertrin⁴, Anderson F Cunha⁷, Fernando F Costa⁴, Aderson S Araujo⁵, Patrícia M Moura³, Leuridan Torres⁶, Antonio R Lucena-Araujo^{1*}, Marcos A Bezerra¹

¹Department of Genetics, Centre of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ²Post-Graduate Program-RENORBIO, University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ³Department of Medical Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil; ⁴Haematology and Hemotherapy Centre, University of Campinas, São Paulo, Brazil; ⁵Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil.

RED CELLS, IRON, and ERYTHROPOIESIS

Association of TGF- β pathway polymorphisms with development of leg ulcers in sickle cell anemia

Diego A Falcão¹, Luana L Prado¹, Isabela C Farias¹, Igor F Domingos¹, Diego A Pereira-Martins¹, Marina Cadena⁶, Taciana F Mendonça², Luydson V Silva², Maria S Cavalcanti³, Kleber Y Fertrin⁴, Anderson F Cunha⁷, Fernando F Costa⁴, Aderson S Araujo⁵, Patrícia M Moura³, Leuridan Torres⁶, Antonio R Lucena-Araujo^{1*}, Marcos A Bezerra¹

Affiliations: ¹Department of Genetics, Centre of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ²Post-Graduate Program-RENORBIO, University of Ceará, Fortaleza, Brazil; ³Department of Medical Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil; ⁴Haematology and Hemotherapy Centre, University of Campinas, São Paulo, Brazil; ⁵Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil.

* **Corresponding author:** Antonio R Lucena-Araujo. Department of Genetics, Centre of Biological Sciences. Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil. Tel: +55-81-2126-7825. Fax: +55-81-2126-7825.

Email: araujoarl@hotmail.com

Running title: TGF β -pathway polymorphisms modulates leg ulcers in SCA

Text word count: 1,753 words.

Number of figures: 2 figures.

Number of tables: 1 table.

Number of references: 18 references.

Number of manuscript pages: 16 pages.

ABSTRACT

Leg ulcers are one of the most common clinical manifestations of sickle cell anemia (SCA). In SCA, leg ulcers present a high rate of reoccurrence, delayed wound healing and a higher probability of becoming chronic. The triggering mechanisms involve hemolytic and vaso-occlusive episodes, and polymorphisms in regulatory genes of the TGF- β pathway were identified recently as contributors of this process. Polymorphisms in genes that regulate this pathway are considered as promising molecular targets in the elucidation of the pathophysiology of leg ulcers. Therefore, our aim was to investigate the relationship of the polymorphisms in *TGFBR3*, *TGFBR3*, *SMAD7* and *SMURF1* genes with the occurrence of leg ulcers in patients with SCA. Our cohort consist of 275 (100 leg ulcer positive and 175 leg ulcer negative) unrelated SCA. Using the recessive model of analysis, we found an association between homozygous variants (AA; CC; GG) and the higher incidence of leg ulcers in Pernambuco SCA patients for *TGFBR3* ($P=0.025$), *SMAD7* ($P<0.001$) and *SMURF1* ($P=0.041$). Moreover,, patients with homozygous genotypes had a higher rate of leg ulcers development. Additionally, patients with leg ulcer and *TGF β 3* AA-genotype have the highest levels of TGF β 1 ($p=0,041$), and these may be explained by a compensatory mechanism. In summary, our results demonstrated that the studied polymorphisms are involved in the occurrence of leg ulcers in cohorts of patients with sickle cell anemia, showing up as potential phenotypic modulators of sickle cell disease.

KEY WORDS: Sickle cell disease, leg ulcers, TGF- β pathway

KEY POINTS

- *TGFβR3*, *SMAD7* and *SMURF1* polymorphisms are associated with leg ulcers development in sickle cell anemia patients
- Patients with leg ulcer and *TGFβR3* AA-genotype have the highest levels of TGFβ1

INTRODUCTION

In the clinical setting, leg ulcers represent the most common cutaneous manifestation in adult patients with sickle cell anemia (SCA) and constitute the leading cause of disabling and morbidity of these patients¹⁻². Although leg ulcers pathogenesis is multifactorial, several evidence attribute to the deregulation/perturbing of transforming growth factor beta (TGF- β)-signaling pathway as an important causes of leg ulceration in both non-SCA and SCA patients³⁻⁴. Similar to others studies we have previously demonstrated the clinical importance of specific genetic variants on the development of some clinical manifestations in SCA, in particular cerebrovascular disease⁵⁻⁷. In this context, it is conceivable that leg ulceration in SCA could also harbor. Here, we retrospectively aim to deduce the prognostic relevance of four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to TGF-B pathway in leg ulceration and their prognostic importance in haemoglobin SS-genotyped patients followed at a single reference centre in Pernambuco, northeast Brazil.

METHODS

Patients

The follow up was last updated in March 2017. From February 2015 to March 2016, peripheral blood (PB) from 275 unrelated adult patients with SCA samples were collected, and genomic DNA was extracted using standard methods. All patients were diagnosed and followed in a single reference center in Pernambuco, northeast Brazil. Clinical history was obtained from the medical records, and according to the presence or absence of the leg ulcer, patients were stratified as leg ulcers positive (100 patients) or leg ulcers negative (175 patients) groups. This study was approved by the local Research Ethics Board (#035/10) and, in accordance with the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients or, whenever applicable, from relatives.

Genotyping of TGF β family members

Following DNA extraction, *TGFBR2* (rs1019856, Assay ID: C_8778181_10, Applied BioSystems), *TGFBR3* (rs2038931, Assay ID: C_12002200_10, Applied BioSystems), *SMAD7* (rs736839, Assay ID: C__1076359_10 Applied BioSystems), *SMURF1* (rs219825, Assay ID: C__1076359_10, Applied

BioSystems) polymorphisms was detected by real-time PCR using the SNP genotyping assay (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

Quantification of the *TGFB1* ligand

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from fresh PB using Ficoll–Paque Plus (SIGMA, St. Louis, MO) and resuspended in RPMI-1640 medium (Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA), 10 mM HEPES buffer (Gibco, Carlsbad, CA), 100 U/ml penicillin (SIGMA, St. Louis, MO) and 100 µg streptomycin (SIGMA®, St. Louis, MO). Next, 1×10^6 cells/ml were cultured at 37°C for 24h in the presence or not of phytohemagglutinin (PHA, SIGMA®, St. Louis, MO), followed by TGFB1 ligand quantification from the supernatant using TGFβ1 Emax® ImmunoAssaySystem (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Descriptive analyses were performed for patient baseline features. Fisher's exact test or Chi-square test, as appropriate, were used to compare categorical variables, with the Wilcoxon rank-sum test used to compare continuous variables. Cumulative incidence curves were constructed reflecting time to leg ulcer development, with the log-rank used for comparison of curves. All *P*-values were two sided with a significance level of 0.05. Statistical analyses were performed using Stata Statistic/Data Analysis version 12 (Stata Corporation, USA) software.

RESULTS

Genotyping of *TGFβR*, *TGFβR3*, *SMAD7* and *SMURF* genes

The main results are summarized in table 1. The groups of patients with SCA were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). There was no statistical difference between SCA patients and controls for the *TGFβR2* polymorphism. However, the presence of the rs2038931 in the *TGFβR3* gene was associated with risk factor for leg ulcers development in sickle cell disease patients (AA vs AG + GG, OR: 9.19, 95% CI: 1.02-210.2, $P = 0.0252$). Thus, the homozygous for this polymorphism and the presence of the A-allele, appear to be related to the leg ulcers (A vs G, OR: 1.66, 95% CI: 1.02-2.7, $P = 0.0398$).

When we evaluated the polymorphisms of the *SMAD7* (CC vs CT + TT, OR: 0.267, 95% CI: 0.14-0.5, $P < 0.001$) and *SMURF1* (GG vs CG + CC, OR: 0.515, 95% CI 0.28-0.94, $P = 0.041$) genes, we obtained similar results. We found an association between homozygous variants and the higher incidence of leg ulcers in patients. In agreement, the cumulative probability of leg ulcer was significantly higher for patients with the *TGF β 3* AA-genotype ($P < 0.001$), *SMAD7* CC genotype ($P < 0.001$) and *SMURF1* GG-genotype ($P = 0.009$)(Figure 1).

Cell Culture – ELISA

The main results from Cell Culture are summarized in Figure 2. Our analyzes were performed in groups according to the rs2038931 (G→A) *TGF β 3* genotype, which are described below: Group 1 → Leg Ulcer Positive/AA genotype, Group 2 → Leg Ulcer Positive/GG genotype, Group 3 → Leg Ulcer Negative/AA genotype, Group 4 → Leg Ulcer Negative/GG genotype. Additionally we add a group to improve our analyzes: Group 5→ Healthy controls. In our data, we observed that Group 1 patients has significantly higher levels of TGF β 1 than the other groups ($P = 0.041$) (Figure 2)

DISCUSSION

TGF β is related to several important functions such as cancer, gastric ulcers, fibrotic disorders and development and maintenance of leg ulcers in non-SCA patients^{4,8-9}. Similarly, many authors have stressed the importance of TGF β pathway in the inflammatory process, and the absence of their receptors is related to wound healing and repair, and consequently to the development of these chronic wound, regardless of its etiology^{8,10-13}. The present study found a correlation with the development of leg ulcers, in such a way that patients who are homozygous for the *TGF β 3* polymorphism, has a higher risk to develop leg ulcers in SCA patients. Similarly to our findings, Nolan et al. (2006), in a multicenter study with patients with sickle cell anemia in the United States in a sample of 243 cases with SCD that had a history of leg ulcer and 516 controls without leg ulcers, demonstrated that polymorphisms localized in TGF- β pathway genes (*TGF β 2*, *TGF β 3*, *SMAD7*, *SMURF1*, *MAP3K7*) are associated with the leg ulcers in SCD³. Furthermore, immunohistochemistry and genic expression studies revealed that TGF- β receptors are reduced in chronic

wound in non-SCA patients⁴. It is possible that, in our population, the rs2038931 polymorphism contributes to reducing the *TGFβR3* expression, thereby decreasing the activation of target genes responsible for the maintenance of homeostasis of epithelial tissue, increasing the likelihood of developing leg ulcers⁴. Additionally, our cytokine evaluations indicate that patients with leg ulcer and *TGFβR3* AA-genotype have the highest levels of TGβ1, and these may be explained by a compensatory mechanism. Therefore, when a decreased expression of the *TGFβR3* gene is present, there is an increase in TGβ1 production as compensatory mechanism to maintain homeostasis of the epithelial tissue.

The expression of R-SMADS (*SMAD2* and *3*) and I-SMAD (*SMAD7*) genes in biopsies of active venous ulcers showed that late healing processes exhibit a significant expression of *SMAD7* and a decrease in the expression of *SMAD2* and *3*, with a consequent decrease in TGF-β receptor expression. Therefore, if this pathway is deregulated, there will be no activation of genes for reepithelialization, cell growth and angiogenesis⁴. Meta-analysis studies have shown that the intronic polymorphisms rs4939827 and rs4464148 in the *SMAD7* gene have been associated as a risk factor for the development of rectal colon cancer in populations with Caucasian and Asian patients¹⁴⁻¹⁵. The hypothesis pointed out by these studies emphasizes the role of the polymorphisms located in the intronic regions in the regulation of the process of alternative splicing and gene expression¹⁵. Additionally, the expression of *SMURF1* in pancreatic cancer biopsies with high cell invasion rates are elevated, and silencing *SMURF1* gene with miRNA (micro RNA) in the culture of cells obtained from biopsies decrease the proliferation of the cancer cells¹⁶. Therefore, the search for new molecular markers in the TGF-β pathway inhibitory proteins (*SMAD7* and *SMURF1*) becomes a logical target in the association with cutaneous complications in sickle cell anemia. Our data point to the involvement of these polymorphisms as risk factors in the occurrence and/or as contributors in the late healing process of leg ulcers in patients with SCA. However, we still cannot say how these polymorphisms are regulating the expression of genes and interfering in the function of these proteins, but if inhibitory proteins involved in TGF-β pathway are being expressed in great quantity, there will be no formation of the *SMAD2/SMAD3* complex and consequently there will be a decrease in the expression of the *TGFβR1* and *TGFβR2* receptors for the cytokine, inactivating the target gene expression¹⁷. In view of the importance of

the role of TGF- β in the healing process, a better understanding of the balance of gene expression of pathway regulators is necessary, especially in patients with sickle cell anemia, since the healing process of the ulcers is aggravated not only by the clinical situation of the patients, but also the environmental and socioeconomic factors that involve the disease^{4,18}. Although the four polymorphisms evaluated in this study have a potential effect on the development of leg ulcers, the functional evaluation of transcript levels and TGF- β pathway coded proteins are also important to understand the real impact of these variants on the modulation of the phenotypes presented by SCA patients with leg ulcers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge all subjects and their parents for their cooperation in this study. This work was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Grant #483714/2013-5).

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no competing financial interests to declare.

REFERENCES

1. Steinberg MH (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The scientific world journal. Special issue: hemoglobinopathies. Review.* 8: 1295-1324.
2. Paladino SF (2007) Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 29(3): 288-290.
3. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, et al. (2006) Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *British Journal Haematology* 133(5): 570–578.
4. Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M (2010) Attenuation of the Transforming Growth Factor β -Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers. *Mol Med* 16: 92-101
5. Balding J, Livingstone WJ; Pittock SJ, Mynett-Johnson L, Ahern T, Hodgson A and Smith OP (2004) The IL-6 G-174C polymorphism may be associated with ischaemic stroke in patients without a history of hypertension. *Ir J Med Sci* 173(4):200-3.
6. Chakraborty B, Chowdhury D, Vishnoi G, Goswami B, Kishore J and Agarwal S (2013) Interleukin-6 Gene -174 G/C Promoter Polymorphism Predicts Severity and Outcome in Acute Ischemic Stroke Patients from North India. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22(5):683-9.

7. Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG et al. (2014) Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol* 93:1123–1129. doi: 10.1007/s00277-014-2016-1
8. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW. (2002) Transforming growth factor beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet.Med.*19:440–7
9. Scollen S, Luccarini C, Baynes C, et al. (2011) TGF- β Signaling Pathway and Breast Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:1112-1119.
10. Cowin AJ, et al. (2001) Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. *J. Invest. Dermatol.* 117:1282–9
11. Beck Is, et al. (1993) One systemic administration of transforming growth factor-beta 1 reverses age- or glucocorticoid-impaired wound healing. *J. Clin. Invest.* 92:2841–9.
12. Ramirez H, Patel SB, Pastar I (2013) The role of TGF- β signaling wound epithelization. *Advances In Wound Care* 3(7): 482-491.
13. Ramirez HA, Liang L, Pastar I, et al. Comparative Genomic, MicroRNA, and Tissue Analyses Reveal Subtle Differences between Non-Diabetic and Diabetic Foot Skin. Brandner JM, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0137133. doi:10.1371/journal.pone.0137133.
14. Yao K, Hua L, Wei L, Meng J, Hu J (2015) Correlation Between CASC8, SMAD7 Polymorphisms and the Susceptibility to Colorectal Cancer. An

- Updated Meta-Analysis Based on GWAS Results. *Medicine (Baltimore)*, 94(46): e1884.
15. Slattery ML, Herrick J, Curtin K, Samowitz W, Wolff RK, Caan BJ, Duggan D, Potter JD, Peters U (2010) Increased Risk of Colon Cancer Associated with a Genetic Polymorphism of SMAD7. *Cancer Res.* 70(4): 1479–1485.
16. Kwei KA, Shain AH, Bair R, Montgomery K, Karikari CA, Matt van de Rijn, Hidalgo M, Maitra A, et al (2011) SMURF1 Amplification Promotes Invasiveness in Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* 6(8): e23924
17. Tang L-x, He R-h, Yang G, Tan J-j, Zhou L, et al. (2012) Asiatic Acid Inhibits Liver Fibrosis by Blocking TGF-beta/Smad Signaling In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE* 7(2): e31350.
18. Minniti CP, Delaney Kara-Marie H, Gorbach AM, et al (2013) Vasculopathy, inflammation and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, 89(1):1-6.

Supplemental table 1. Polymorphisms associated with the incidence of leg ulcer in patients with SCA.

Gene	SNP ID	Minor allele	Genetic model	Odds ratio	95% CI		P-value
<i>SMAD7</i>	rs736839	T	Dominant	1.1	0.5	2.38	0.813
			Codominant	1.8	1.13	2.87	0.001
			Recessive	2.95	1.6	5.43	0.001
<i>SMURF</i>	rs219825	G	Dominant	0.77	0.47	1.25	0.289
			Codominant	1.36	0.99	1.87	0.042
			Recessive	1.79	1.15	3.17	0.041
<i>TGFBR2</i>	rs1019856	T	Dominant	1.15	0.69	1.92	0.588
			Codominant	0.82	0.5	1.34	0.433
			Recessive	-			
<i>TGFBR3</i>	rs2038931	A	Dominant	0.63	0.37	1.07	0.119
			Codominant	1.69	1.1	2.72	0.027
			Recessive	9.15	1.1	79.53	0.025

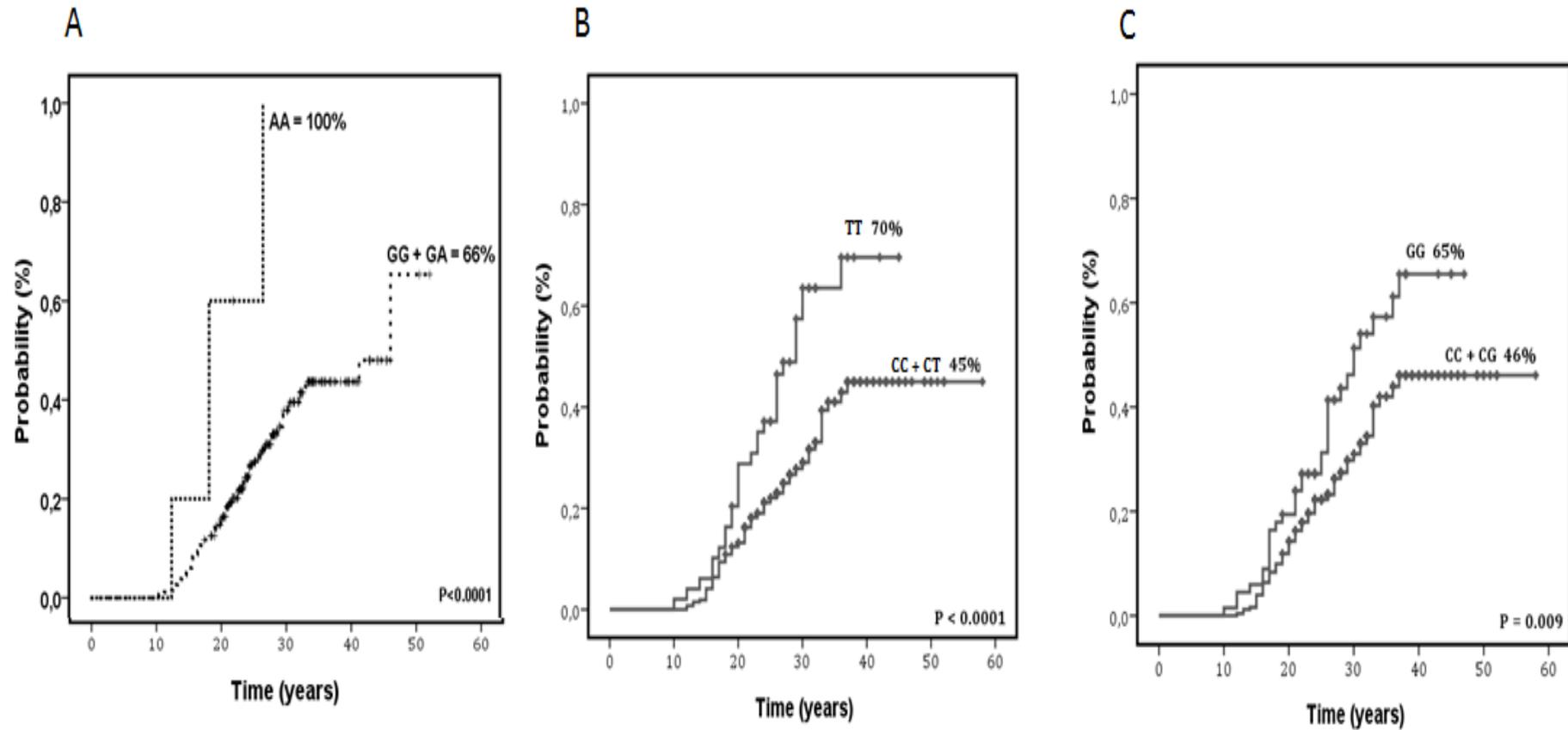


Figure 1. Cumulative probability of leg ulcer. for TGFBR3 (A), SMAD7 (B) and SMURF 1 (C) genotypes

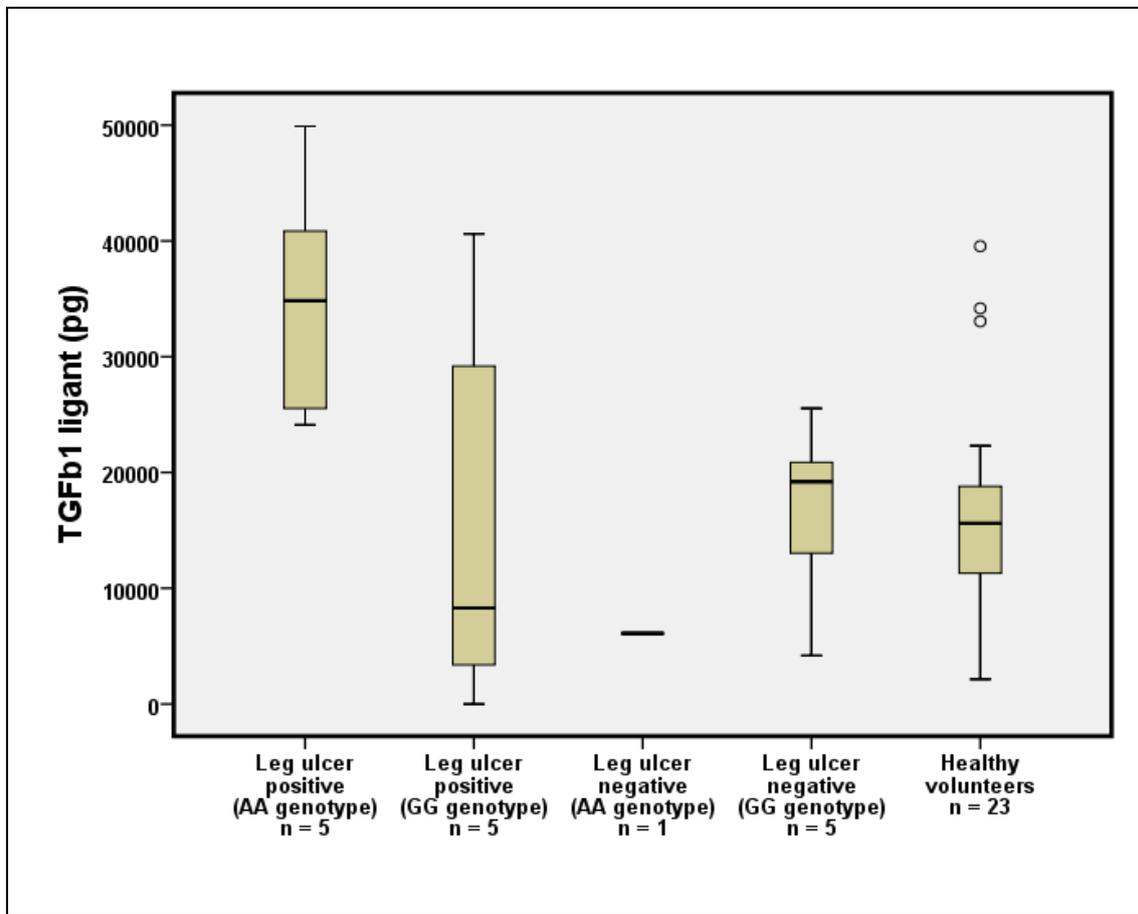


Figure 2. Levels of TGF β 1 related to TGFBR3 genotypes

5 DISCUSSÃO GERAL

Vários estudos sugerem que alterações genéticas podem influenciar o desenvolvimento do AVC (Driscoll et al., 2003; Kwiatkowski et al., 2003; Hoppe et al., 2004; Voetsch et al., 2007), e seus efeitos podem modificar o curso clínico da AF (Sarnaik & Ballas, 2001; Hoppe et al., 2004; Sebastiani et al., 2010). A natureza multifatorial da AF envolve episódios de vaso-oclusão e crises hemolíticas, além da ativação de mediadores inflamatórios, disfunção endotelial e estresse oxidativo (Conran et al., 2009). Em pacientes com AF, o estresse oxidativo pode causar danos aos eritrócitos, reduzindo sua vida média (Amer & Fibach, 2005). Desse modo, alterações genéticas relacionadas a processos inflamatórios, podem constituir uma ferramenta prognóstica importante na doença.

A anemia falciforme é reconhecida como uma doença que apresenta um quadro inflamatório crônico (Steinberg, 2006) e, como em outras doenças crônicas, o equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias encontra-se comprometido (Hibbert et al. 2005). Em pacientes com AF, níveis aumentados e diminuídos de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, respectivamente, já foram descritos quando comparados com indivíduos saudáveis (Bourantas et al., 1998; Makis et al., 2000; Hibbert et al. 2005). Apesar disso, os efeitos das moléculas inflamatórias na AF ainda são pouco esclarecidos (Lanaro et al., 2009). Algumas evidências sugerem que o genótipo IL6 G-174C CC podem aumentar os níveis séricos de IL-6; conseqüentemente, este polimorfismo pode atuar como fator de risco para o desenvolvimento do AVC (Brull et al., 2001; Kilpinen et al., 2001), apesar de Burzotta em 2001 ter achado efeitos opostos. Esse efeito regulatório poderia estar por trás dos desfechos adversos previstos para o polimorfismo IL6 G-174C no desenvolvimento de acidente vascular cerebral, não apenas na população geral (Chakraborty et al, 2013), mas também para pacientes com AF.

Entretanto, as associações descritas com esse polimorfismo em populações não falciformes são bastante variáveis. Titov e cols (2012) e Chakraborty e cols. (2013) analisaram pacientes russos e indianos, respectivamente, e encontraram associação entre o *IL6* G-174C (rs1800795) e o desenvolvimento do AVC, resultados que não foram corroborados por Balding e cols. (2004) e Tuttolomondo e cols. (2012), ao analisarem pacientes irlandeses e italianos, respectivamente.

Em nossa coorte, encontramos associação entre o polimorfismo *IL6* G-174C (rs1800795) com o desenvolvimento do AVC, de um modo que o genótipo CC atua como fator de risco (3x maior quando comparado com os genótipos GG e GC) para o desenvolvimento do AVC. Nossos dados sugerem que pacientes com DTC normal e condicional poderiam se beneficiar através de marcadores moleculares (como o polimorfismo *IL6* G-174C), afim de adicionar seu valor preditivo à triagem de DTC. É importante observar que os estudos STOP recomendam que os pacientes com DTC normal e condicional sejam monitorados anualmente e trimestralmente, respectivamente; enquanto isso, esses pacientes poderiam desenvolver acidente vascular cerebral.

Apoiamos a ideia de que melhorias na prevenção do AVC primário são necessárias, em particular para pacientes com idade avançada. Tais iniciativas poderiam ser alcançadas integrando variações de prognóstico genético com as recomendações do estudo STOP multicêntrico (Adams et al, 1998), a fim de fornecer uma terapia ajustada ao risco prevista para melhorar os resultados dos pacientes.

Embora tenhamos demonstrado que o polimorfismo *IL6* G-174C está associado ao risco de acidente vascular cerebral em pacientes com SCA, nossos dados devem ser tomados com cautela. A maioria dos pacientes tem menos de 18 anos de idade e não podemos descartar a chance de acidente vascular cerebral após a segunda década de vida. Além disso, 35% dos pacientes com DTC normal foram tratados com hidroxycarbamida devido a outras complicações não relacionadas ao AVC, e essa intervenção pode se sobrepor aos achados genéticos e subestimar nossos resultados. Finalmente, as validações em coortes independentes podem fortalecer significativamente nossos achados.

Com relação ao desenvolvimento das úlceras de membros inferiores no contexto da AF, estudos de associações de polimorfismos genéticos também vêm ganhando um valor muito importante e seu estudo pode esclarecer alguns questionamentos a respeito da variabilidade fenotípica da AF (Galarneau et al., 2013; Mtatiro et al., 2014).

Nolan e colaboradores (2006) encontraram associação de polimorfismos com úlceras maleolares, em uma amostra de 759 pacientes com anemia falciforme oriundos de centros de referência para hemoglobinopatias nos Estados Unidos (Nolan et al., 2006). Foram analisados 243 pacientes com histórico de úlceras e 516

pacientes que não desenvolveram as úlceras. Os genes candidatos foram selecionados de acordo com seu envolvimento na modulação na fisiopatologia da doença, atuando em vias de: estresse oxidativo, metabolismo do NO, fatores de crescimento e mediadores da inflamação e angiogênese. A partir do mapeamento realizado, 129 SNPs de 47 genes possivelmente relacionados com UM foram avaliados, sendo os principais, pertencentes à superfamília do TGF- β : TGF β RII (3p22) e TGF β RIII (1p33-p32), *SMURF1* (rs219825) e *SMAD7* (rs736839).

A desregulação da função e dos níveis destas proteínas estão correlacionados com diminuição da expressão dos receptores do TGF- β que conseqüentemente altera toda a transdução de sinais intracelulares, ocasionando distúrbios fibróticos e de proliferação celular, (Nolan et al, 2006; Liu & Pravia, 2010; Pastar et al., 2010) e outras funções importantes, como câncer, úlceras gástricas e desenvolvimento e manutenção de úlceras de perna em pacientes não falciformes (Jude et al., 2001; Scollen et al., 2011; Pastar et al., 2010).

Uma importante contribuição ao entendimento da via de sinalização do TGF- β , vem a partir do trabalho de Doss e colaboradores (2012). Utilizando ferramentas de bioinformática, criaram uma lista de 4.035 SNPs nos genes da família das SMADs correlacionando-os com os possíveis efeitos funcionais das proteínas resultantes da codificação destes genes. Aproximadamente 1.733 dos SNPs encontrados estão localizados em regiões não codificantes (íntrons) podendo influenciar no *splicing* alternativo bem como por outras vias de regulação gênica, alterando a função das proteínas resultantes (Doss et al., 2012). Diante da importância de um perfeito funcionamento da via de sinalização do TGF- β , buscamos investigar esta via, e a relação com a ocorrência das úlceras de perna em nossa população de pacientes falciformes.

No presente estudo não foi verificada associação com os SNPs dos genes do gene *TGFBR2*, provavelmente pela amostragem não ser suficiente, diferentemente de alguns trabalhos, como o de Nolan em 2006.

Com relação ao polimorfismo rs2038931 do gene *TGFBR3*, o presente estudo encontrou associação com o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores, de uma maneira tal, que os pacientes que são homocigotos para o polimorfismo, tem um risco maior de desenvolver essa manifestação clínica na população de pacientes

falciformes estudada. Da mesma forma que este estudo, Nolan em 2006, também encontrou resultados semelhantes, sendo o único trabalho da literatura que pesquisou este polimorfismo, até onde sabemos.

Pastar em 2010, por imunohistoquímica e análise de expressão, verificou que em úlceras que não cicatrizavam, a expressão dos receptores do TGF- β estão diminuídas. É possível que em nossa população, o polimorfismo rs2038931 contribua para a diminuição da expressão do *TGF β R3*, diminuindo assim a ativação de genes alvo, responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido epitelial, aumentando a probabilidade de desenvolver úlceras de membros inferiores.

Além disso, nossas avaliações de citocinas indicam que os pacientes com úlcera de perna e genótipo AA para o polimorfismo do TGF β R3 apresentam os maiores níveis de TG β 1, e isso pode ser explicado por um mecanismo compensatório. Portanto, quando a expressão do gene TGF-R3 está diminuída, é biologicamente possível que aconteça um aumento na produção de TG β 1 como mecanismo compensatório para manter a homeostase do tecido epitelial.

A expressão dos genes R-SMADS (SMAD2 e 3) e I-SMAD (SMAD7) em biópsias de úlceras venosas ativas mostrou que processos de cicatrização tardia exibem expressão significativa de SMAD7 e diminuição da expressão de SMAD2 e 3, com conseqüente diminuição na expressão do receptor de TGF- β . Portanto, se essa via for desregulada, não haverá ativação de genes para reepitalização, crescimento celular e angiogênese (Pastar et al., 2010). Recentemente, estudos de metanálise mostraram que os polimorfismos intrônicos rs4939827 e rs4464148 no gene SMAD7 foram associados com fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cólon retal em populações de pacientes caucasianos e asiáticos (Yao et al., 2015; Slattery et al., 2015). al., 2010).

A hipótese apontada por esses estudos enfatiza o papel dos polimorfismos localizados nas regiões intrônicas na regulação do processo de splicing alternativo e expressão gênica (Slattery et al., 2010). Portanto, a busca por novos marcadores moleculares nas proteínas inibidoras da via do TGF- β (SMAD7 e SMURF1) torna-se um alvo lógico na associação com complicações cutâneas na anemia falciforme. Nossos dados apontam para o envolvimento desses polimorfismos como fatores de risco no surgimento e / ou manutenção das úlceras de perna em pacientes com AF.

Se as proteínas inibitórias envolvidas na via do TGF- β estão sendo expressas em grande quantidade, não haverá formação do complexo SMAD2 / SMAD3 e conseqüentemente haverá uma diminuição na expressão dos receptores TGF β R1 e TGF β R2 para a citocina, inativando a expressão dos genes alvo (Tang Lx et al., 2012).

Tendo em vista a importância do papel do TGF- β no processo de cicatrização, é necessário um melhor entendimento do equilíbrio da expressão gênica dos reguladores das vias, principalmente em pacientes com anemia falciforme, uma vez que o processo de cicatrização das úlceras se agrava não somente pela situação clínica dos pacientes, mas também pelos fatores ambientais e socioeconômicos que envolvem a doença (Pastar et al., 2010; Minniti et al., 2013). Embora os quatro polimorfismos avaliados nesta via tenham um efeito potencial sobre o desenvolvimento de úlceras de perna, a avaliação funcional dos níveis de transcrição e proteínas codificadas pela via TGF- β também é importante para entender o real impacto dessas variantes na modulação dos fenótipos apresentados por pacientes falciformes com úlceras maleolares.

6 CONCLUSÕES

- O polimorfismo do gene *IL6* G174C está associado com o desenvolvimento de acidente vascular cerebral em pacientes com anemia falciforme;
- Os polimorfismos dos genes *TGFβR3* (rs2038931), *SMAD7* (rs786839) e *SMURF1* (rs219825) estão associados com o desenvolvimento de úlcera de membros inferiores em pacientes com anemia falciforme, além de os genótipos variantes favorecerem o desenvolvimento precoce de úlceras maleolares quando comparados com os pacientes com genótipo selvagens e heterozigotos;
- Níveis mais altos de TGFβ1 foram encontrados em pacientes que apresentam o polimorfismo do gene *TGFβR3* (rs2038931) em homozigose, apresentando assim mais um indício da importância da via do TGF-β no desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme;

REFERÊNCIAS

Adams, R. et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. **N Engl J Med** 326(9):605-10, 1992.

Adams, R.J. et al. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. **Blood** 103(10):3689-94, 2004.

Adewoye, A.H. et al. Association of Polymorphisms of IGF1R and Genes in the Transforming Growth Factor- β /Bone Morphogenetic Protein Pathway with Bacteremia in Sickle Cell Anemia. **Genetics of Bacteremia in Sickle Cell Anemia** 43:593-598, 1992.

Akinsheye, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood** 7;118(1):19-27, 2011.

Alavi, A. and Kirsner, R.S. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. **Int J Low Extrem Wounds** 14:213–6, 2015.

Ali, S.B. et al. Stroke recurrence in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea following first clinical stroke. **Am J Hematol** 86(10): 846-50, 2011.

Araújo, M.C.P.E. et al. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cad Saude Publica** 20:123–128, 2004.

Armenis, I. et al. Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. **Nitric oxide Biol Chem** 62:17–23, 2017.

Arno, A.I. et al. New Molecular medicine-based scar management strategies. **Burns** 40:539-551, 2014.

Asbeutah, A.M.; AlMajran, A.A.; Adekile A. Pattern of cerebral blood flow and the interrelationship of vascular parameters of transcranial Doppler imaging in children with sickle cell disease. **J Clin Ultrasound**;1–5, 2018

Attisano, L. and Wrana, J. Mads and Smads in TGF- β signaling. **Cell Regulation** 10:188-194, 1998.

Awad, M.R. et al. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Europe PMC** 66(8):1014-1020, 1998.

Balding, D.J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature Reviews-Genetics** 7:781-791, 2006.

Baldwin, C. et al. Association of klotho, bone morphogenetic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood**. 106(1):372-375, 2005.

- Ballas, S.K; Mohandas, N. Pathophysiology of vaso-occlusion. **Hematology / Oncology Clinics of North America - Sickle Cell Disease**. V. 10(6), p. 1221-39, 1996.
- Ballas, S.K. et al. Exposure to hydroxyurea and pregnancy outcomes in patients with sickle cell anemia. **J Natl Med Assoc** 101(10):1046-51,2009.
- Bandeira, F.M. et al. Hemoglobin “S” positive newborn detected by cord blood and its characteristics. **J Pediatr(RioJ)**,75(3): 167-7, 1999
- Bernaudin, F. et al. Chronic, acute anemia and e ICA stenosis are independent risk factors for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. **Blood**, 2014
- Bhatnagar, P. et al. Genome-Wide Meta-Analysis of Systolic Blood Pressure in Children with Sickle Cell Disease. **PlosOne**. 8(9): e74193, 2013.
- Blobe, GC; Schiemann, WP; Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor b in human disease. **N Engl J Med** 342:1350±1358, 2000
- Bonham, V. L. The psychosocial impact of leg ulcers in patients with sickle cell disease: I don't want them to know my little secret. **PLoS ONE**, 12(10), e0186270, 2017
- Bowers, A.S. et al. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. **PLOS ONE** 8:e68929, 2013.
- Brasil. Ministério da Saúde, Portaria nº 872 de 12 de Novembro de 2002. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas-Doença Falciforme-Hidroxiuréia**, 2002.
- Brawley, O.W. et al. National Institutes of Health consensus development conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **Ann Intern Med** 148(12):932-8, 2008.
- Cançado, R.D.; Jesus, J.A. Sickle cell disease in brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. V.29(3); p.204-206, 2007.
- Cappellini, M.D. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 74–78, 2007.
- Chakraborty, B. Interleukin-6 Gene -174 G/C Promoter Polymorphism Predicts Severity and Outcome in Acute Ischemic Stroke Patients from North India. **J Stroke Cerebrovasc Dis** 22(5):683-9, 2013.
- Charache, S. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med** 332:1317–22, 1995.
- Chen, G.; Chuxia, D.; Yi-Ping, L. TGF-β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. **Int. J. Biol. Sci.** 8(2): 272-288, 2012.

- Chiang, E.Y.; Frenette, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am** 19(5): 771-84, 2005.
- Cokic, V.P. et al. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. **Blood** 108:184–91, 2006.
- Cokic, V.P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest** 111:231–9, 2013.
- Collins, F.S.; Brooks, L.D.; Chakravarti, A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. **Genome Research** 8:1229-1231, 1998.
- Connes, P.; Verlhac, S.; Bernaudin, F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. **Br J Haematol** 161(4):484-98, 2013
- Conran, N.; Franco-Penteado, C.F.; Costa, F.F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin** 33:1-16, 2009.
- Cowin, A.J. et al. Effect of healing on the expression of transforming growth factor beta(s) and their receptors in chronic venous leg ulcers. **J. Invest. Dermatol.** 117:1282–9, 2011.
- Darrow, M.C. et al. Visualizing red blood cell sickling and the effects of inhibition of sphingosine kinase 1 using soft X-ray tomography. **J Cell Sci** 129:3511–3517, 2016.
- De Franceschi, L., Cappellini, M.D., Olivieri, O. Thrombosis and sickle cell disease. **SeminThromb Hemost**, 37(3):226-36, 2011.
- Delaney, K.M. et al. Leg ulcers in sickle cell disease: current patterns and practices. **Hemoglobin**, 37:325-332, 2013.
- Doss, C.G.P., Nagasundaram, N., Tanwar, H. Predicting the Impact of Deleterious Single Point Mutations in SMAD Gene Family Using Structural Bioinformatics Approach. **Interdiscip Sci Comput Life Sci** 4: 103-115, 2012.
- Dutra , F.F., Bozza, M.T. Heme on innate immunity and inflammation. **Front Pharmacol** 5 MAY:1–20. doi: 10.3389/fphar.2014.00115, 2014
- Ebisawa, T. et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through smad7 and induces receptor degradation. **The Journal of Biological Chemistry** 276: 12477-12480, 2011.
- Fasano, R.M., Meier, E.R., Hulbert, M.L. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis** 54(1):17-25, 2015.
- Fertrin, K.Y., Costa, F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert reviews of hematology**; v.3(4); p.443-458, 2010.

Fishman, D. The effect of novel polymorphisms in the interleukin- 6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest** 102(7):1369-76, 1998.

Flanagan, J.M. et al. (2011) Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood** 117(24):6681-4, 2011.

Flex, A. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. **Stroke** 35(10):2270-5, 2004.

Frenette, P.S., Atweh, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation** 17:850–858, 2007.

Galarneau, G. et al. Gene-centric association study of acute chest syndrome and painful crisis in sickle cell disease patients. **Blood**. 122 (3): 434-442, 2013.

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

Green, N.S., Barral, S. Emerging science of hydroxyurea therapy for pediatric sickle cell disease. **Pediatr Res** 75:196–204, 2014.

Greisenegger, S. et al. The (-174) G/C polymorphism in the interleukin-6 gene is associated with the severity of acute cerebrovascular events. **Thromb Res** 110(4):181-6, 2003.

Heinrich, P.C., Castell, J.V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J** 265(3):621-36, 1990.

Hoppe, C. Defining stroke risk in children with sickle cell anemia. **Br J Haematol** 128(6):751-66, 2005.

Hoppe, C. et al. Confirmation of an association between the TNF (-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke** 38(8):2241-46, 2007.

Hsu, L.L. et al. Alpha thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. **J Pediatr Hematol Oncol** 25(8):622-8, 2003.

Joseph, L. Sickle Cell Anemia and Comorbid Leg Ulcer Treated With Curative Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. **The International Journal of Lower Extremity Wounds** Vol 16, Issue 1, pp. 56 – 59, 2017

Jude, E.B. Transforming growth factorbeta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabeticfoot ulcers. **Diabet.Med.**19:440–7, 2002.

Kapoor, S. et al. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. **Mayo Clinic Proceedings** , Volume 0 , Issue 0, 2018

- Kato, G.J., Gladwin, M.T., Steinberg, M.H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of Clinical subphenotypes. **Blood Reviews** 21:37-47, 2007.
- Kato, G.J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **Am J Hematol** 84(9):618-25, 2009.
- Kato, G.J., Steinberg, M.H., Gladwin, M.T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **J Clin Invest** 127:750–760, 2017.
- Kawabata, M., Miyazono, K. Bone morphogenetic proteins. In: Canalis E, editor. **Skeletal Growth Factors**. Philadelphia: LippincottWilliams & Wilkins. p 269±290, 2000.
- Kim, B.C. et al. Fibroblasts From Chronic Wounds Show Altered TGF- β Signaling and Decreased TGF- β Type II Receptor Expression. **Journal of Cellular Physiology** 195:331-336, 2003.
- Ladizinski, B. et al. Sickle cell disease and leg ulcers. **Advances in Skin & Wound Care** 25: 420-428, 2012.
- Lagunju, I., Brown, B.J., Sodeinde, O. Hydroxyurea lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia in a Nigerian cohort. **Pediatr Blood Cancer**, 2015.
- Lanaro, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology** 85: 235-242, 2009.
- Lawrence, D.A. Transforming growth factor-beta: an overview. **Kidney Int Suppl.** 49: 19-23, 1995.
- Lezcano, N.E. et al. Regular transfusion lowers plasma free hemoglobin in children with sickle-cell disease at risk for stroke. **Stroke** 37(6):1424–6, 2006.
- Ligi, D. et al. Chronic Venous Insufficiency: Transforming Growth Factor- β Isoforms and Soluble Endoglin Concentration in Different States of Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(10), 2206, 2017.
- Liu, R.M., Pravia, G.K.A. Oxidative stress and glutathione in TGF- β mediated fibrogenesis. **Free Radic Biol Med.** 48: 1-37, 2010.
- Lobo, C.L. et al. (2013) The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. **Br J Haematol** 161(6): 852-60, 2013.
- Lyra, I.M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad Saude Publica**, 21(4): 1287-90, 2005.
- Ma, Y. et al. Lack of an association between interleukin-6 gene promoter polymorphisms (-174G/C, -572G/C) and ischemic heart disease and/or ischemic stroke: a meta-analysis. **Hum Immunol** 72(8):641-51, 2011.

- Marousi, S. et al. Functional polymorphisms of interleukin 4 and interleukin 10 may predict evolution and functional outcome of an ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 18(4):637-43, 2011.
- Massagué, J. TGF- β signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** 67:753–91, 1998.
- Massagué, J. How cells read TGF- β signals. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology** 1: 169-178, 2000.
- Massagué, J., Xi, Q. TGF- β control of stem cell differentiation genes. **FEBS Letters** 586: 1953-1958, 2012.
- Minniti, C.P. et al. Vasculopathy, inflammation and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, 89(1):1-6, 2013.
- Minniti, C.P. et al. Leg Ulcers in Sickle Cell Disease. **American journal of hematology**. 85 (10):831-833, 2010.
- Miyazono, K., Kusanagi, K., Inoue, H. Divergence and convergence of TGF- β /BMP signaling. **JCellPhysiol.** 187:265–276, 2001
- Miyazono, K. et al. Receptors for transforming growth factor- β . **Adv Immunol** 55:181±220, 1994.
- Morris, C.R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 177–185, 2008.
- Mtatiro, S.N. et al. Genome Wide Association Study of Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia in Tanzania. **PlosOne** 9(11):e111464, 2014.
- Naik, R.P. et al. Clinical Outcomes Associated With Sickle Cell Trait: A Systematic Review. **Ann Intern Med.** ;169:619–627. doi: 10.7326/M18-1161,2018
- Nolan, V.G. et al. Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. **British Journal Haematology** 133(5): 570–578, 2006.
- Nourai, M. et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Hematologica** 98: 464-472, 2013.
- Ohene-Frempong, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood** 91(1):288–294, 1998.
- Paladino, S.F. Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter** 29(3): 288-290, 2007.
- Park, H.J. et al. (2011) Association between interleukin-4 gene polymorphisms and intracerebral haemorrhage in Korean population. **Int J Immunogenet** 38(4):321-5, 2011.

Pastar, I. et al. Attenuation of the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers. **Mol Med** 16: 92-101, 2010.

Phelan, M.W., Faller, D.V. Hypoxia decreases constitutive nitric oxide synthase transcript and protein in cultured endothelial cells. **J Cell Physiol** 167(3):469–476, 1996

Platt O.S.M.D. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med** 2008 1362–1369, 2008.

Poniatowski, A.A. et al. Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. **Mediators of Inflammation**, 2015.

Prakash, K. Cerebral Vasoreactivity in Children with Sickle Cell Disease: A Transcranial Doppler Study. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, 2018

Quinn, C.T. Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. **Pediatr Clin North Am** 60:1363–81. doi: 10.1016/j.pcl.2013.09.006, 2013

Ramirez., H, Patel, S.B., Pastar, I. The role of TGF- β signaling wound epithelization. **Advances In Wound Care** 3(7): 482-491, 2013.

Rees, D.C., Williams, T.N., Gladwin, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet** 376 (9757): 2018-2031, 2010.

Rosse, W.F. et al. New Views of Sickle Cell Disease Pathophysiology and Treatment. **Hematol Am Soc Hematol Educ Progr** 2–17, 2000.

Rusanova, I. et al. β -globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panamá. **American Journal of Human Biology**, 23(3):377-80, 2011.

Sakamoto, T.M. et al. Increased adhesive and inflammatory properties in blood outgrowth endothelial cells from sickle cell anemia patients. **Microvasc Res** 90:173-9, 2013

Samanta, D., Datta, P.K. Alterations in the Smad pathway in human cancers. **Frontiers in Bioscience** 17:1281-1293, 2012.

Sarnaik, S.A., Ballas, S.K. Molecular characteristics of pediatric patients with sickle cell anemia and stroke. **Am J Hematol** 67(3):179-82, 2001.

Scollen, S. et al. TGF- β Signaling Pathway and Breast Cancer Susceptibility. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 20:1112-1119, 2011.

Serjeant, G.R. et al. Leg Ulceration in Sickle Cell Disease: Medieval Medicine in a Modern World. **Hematol Oncol Clin N Am** 19:943–956, 2005.

Shi, Y., Massagué, J. Mechanisms of TGF- β Signaling Review from Cell Membrane to the Nucleus. **Cell**, 113, 685–700, 2003.

- Singhal R. et al. Development of pro-inflammatory phenotype in monocytes after engulfing Hb-activated platelets in hemolytic disorders. **Clin Immunol**. doi: 10.1016/j.clim.2016.12.007, 2016
- Soares, A.C. et al. Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Rev Br Hematol Hemoter** 36(4):250-5, 2014
- Solovey, A. et al. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N Engl J Med** 337(22):1584-1590, 1997.
- Sonati, M., Costa, F.F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J Pediatr (Rio J)** 84:40–51. doi: 10.2223/JPED.1802, 2008
- Steinberg, M.H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**. 340:1021–1030, 1999.
- Steinberg, M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol** 129(4):465-81, 2005
- Steinberg, M.H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approach. **Sci World J** 8:1295-34, 2008.
- Steinberg, M.H. et al. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am J Hematol** 85(6):403-408, 2010.
- Suzuki, C. et al. Smurf1 Regulates the Inhibitory Activity of Smad7 by Targeting Smad7 to the Plasma Membrane. **The Journal of Biological Chemistry** 277: 39919–39925, 2002.
- Tanigawa, T. et al. TGF- β Signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing. **Journal of Physiology And Pharmacology** 56:3-13, 2005.
- Turhan, A. et al. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. **Proc Nat Acad Sci USA** 99(5): 3047-51, 2002.
- Umeh, N. I. et al. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. **J Neuroimmunol** 100(1-2):124-39 1999.
- Vichinsky, E.P. Current issues with blood transfusions in sickle cell disease. **Semin Hematol** 38(1):14-22, 2001.
- Wagne, S.C. et al. Neonatal Screening for Hemoglobinopathies: Results of a Public Health System in South Brazil. **Genet Test Mol Biomarkers** 14:565–569, 2010.
- Walton, K. L., Johnson, K. E., & Harrison, C. A. Targeting TGF- β Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**, 8, 461, 2017.
- Wang, W.C. et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet** (London, England) 377:1663–72, 2011.

Weiss, A., Attisano, L. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. **Wiley Periodicals** 2: 47-63, 2013.

Werner, S., Grose, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiol Rev** 83:835-870, 2003.

Wrighton, K.H., Lian, X., Feng, X. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling, **Cell Research** 19:8-20, 2009.

Wyszinski, D.F. et al. Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)** 50(1): 23-33, 2004.

Xu, P., Liu, J., Derynck, R. Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. **FEBS Lett** 586(14): 1871–1884, 2012

Zago, M.A., Pinto, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev Bras Hematol Hemoter** 29:207–214, 2007.

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

Zimmerman, S.A. et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood** 103:2039–45, 2004.

Zimmerman, S.A. et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood** 103(6):2039–2045, 2004.

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA "BLOOD"

Fator de Impacto: 3,885; Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: A1

Instructions for Authors

Articles types

Regular Articles

Maximum length for a Regular Article is 4,000 words of text - counting only the Introduction, Methods, Results, and Discussion. Submissions are limited to a total of 7 figures, and digital images are required. We recommend a limit of 100 references. The sections of a Regular Article should be ordered as follows: Abstract; Introduction; Methods (must include sufficient information to allow readers to understand the article content); Results; Discussion; Acknowledgements; Authorship Contributions; Disclosure of Conflicts of Interest; References; Tables; Figure Legends; Figures.

Supplemental data - to be published online only - may include additional information regarding methodology, supplemental figures or tables, or primary data sets; it must be submitted with the original manuscript submission, so it can be peer reviewed. (See "Supplemental data")

Any involvement of medical writers/researchers, particularly those employed or supported by the pharmaceutical industry, in the writing of an article must be clearly defined and disclosed in the Authorship and/or the Acknowledgements section(s) as appropriate. This type of involvement must also be disclosed to the Editor-in-Chief in the Cover Letter. For more information, see the journal Conflict of interest disclosure and the editorial policies for authors.

Brief Reports

Short manuscripts definitively documenting either experimental results or informative clinical observations will be considered for publication in this category. Single-case reports or case series cannot be accommodated unless they elucidate very novel and important disease biology or approaches to therapy. Brief Reports are not intended to allow publication of incomplete or preliminary findings. The review process is equally rigorous as for Regular Articles and the acceptance rate is lower. Brief Reports may not exceed 1,200 words of text -counting only the Introduction, Methods, Results, and Discussion. Abstracts must not exceed 200 words and should be a single paragraph with no subheadings. Only 2 figures/tables and 25 references may be included. The sections of a Brief Report should be ordered as follows: Abstract; Introduction; Methods (must include sufficient information to allow readers to allow reproduction of the data); A combined Results and Discussion section; Acknowledgements; Authorship Contributions; Disclosure of Conflicts of Interest; References; Tables; Figure Legends; Figures.

Manuscript Submission

Before submitting your manuscript online at Blood Bench>Press, please read and carefully follow the guidelines below. Any deviations could result in significant delay in the submission and review process.

Please note that Blood adheres to the criteria of the International Committee of Medical Journal editors, which has established Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

Manuscript length restrictions

Please adhere to the length, figure/table and reference number restrictions described on the previous page for each article type. On the title page, include a text word count, abstract word count, the number of figures and tables, and the number of references. Submissions exceeding these limits will not be considered for review and will be returned to the author.

Manuscript organization

Organize the content of your manuscript file as follows: Title Page, Key Points, Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Authorship Contributions, Conflict of Interest Disclosures, References, Tables, Figure Legends, and Figures. For Brief Reports, Results and Discussion must be combined. Your text document must include page numbers, meaning there must be page numbers inserted into the header or the footer of your document.

Article title and title page

The title should succinctly and effectively convey to non-specialists the content of the article with no more than 120 characters, including spaces. Titles should be in active

rather than passive voice, without the use of punctuation or abbreviations. If commonly-understood abbreviations are included in the title, they must be defined in the abstract. If the article reports on results utilizing solely non-human model systems, the species must be indicated in the title.

Title page must contain the following: article title; short title for the running head (not to exceed 50 characters, including spaces between words); full and accurate names of all authors (as you want them to appear in online searches and citations); affiliations of institutions where the research was done, reflecting the order of authorship by using superscripted numbers; corresponding author's full name, address, e-mail address, and phone and fax numbers; word counts for text and abstract, figure/table count and reference count.

Regular Articles and Brief Reports should also include on the title page an appropriate scientific category chosen during submission.

Key Points

Blood now publishes 1 to 2 Key Point summaries of research papers - specifically, Regular Articles, Brief Reports, and e-Blood articles. The purpose of these short, bullet-pointed statements is to identify the most relevant outcomes of the paper and to provide a synopsis encapsulating the significance of the research and its implications for readers.

Key Points should be written clearly and succinctly. Avoid using scientific jargon whenever possible. Each Key Point should be no more than 140 characters, including spaces. Key Points are required upon manuscript submission, immediately

preceding the Abstract in both the submission form metadata and the text document, and they will be reviewed by the assigned Editor.

Key Points are published online, in First Edition, and in print immediately preceding the Abstract and will be freely available upon publication. They will not be indexed by PubMed, but will be searchable via Google and other search engines.

Abstract

The abstract should contain 250 words or fewer (200 words or fewer for Brief Reports; check the word count limit in the description for other article types) and succinctly, in a logical progression state the rationale/hypothesis, objectives, findings/results, and conclusions of the study. Abstracts should be a continuous narrative and not broken up into subheadings, and should not contain references.

Authors need to ensure that abstracts are easily readable and understandable to a broad readership. The abstract should accurately reflect the content of the article, be written in plain and succinct language and, as much as possible, avoid jargon and acronyms.

The abstract of a research paper should preferably contain the following elements (per ICMJE recommendations): The context or background for the study. The authors should consider that a vast majority of readers have either no or limited knowledge of the article context: one or two plain-language sentences should clearly describe this background; The study's purpose, i.e., why the study was done. The objectives of the research should be explicitly provided, rather than in general statements; Methods/procedures (selection of study participants, settings, measurements,

analytical methods); Main findings, giving specific effect sizes and their statistical and clinical significance, if possible; Main conclusions and interpretation of findings with emphasis on new and important aspects of the study and/or observations.

Methods

The materials and methods section should be detailed enough to provide clear information on what was done experimentally, including all major experimental plans and procedures. The Journal will not consider manuscripts that include significant portions of the methods section as supplemental data.

Include in the Methods section as appropriate: A statement that the research was approved by the relevant institutional review boards or ethics committees and that all human participants gave written informed consent; A statement regarding the identity of those who analyzed the data and confirming access of all authors to primary clinical trial data; The clinical trial registration number and approved registry name for all clinical trials; For phase 3 randomized clinical trials, we request that the authors provide a flow diagram in CONSORT format and include all of the information required by the CONSORT checklist within the body of the manuscript. When restrictions on length prevent the inclusion of some of this information in the manuscript, it may be provided instead as supplemental data. The CONSORT statement, checklist, and flow diagram are available at <http://www.consort-statement.org>.

For all clinical trials that report on a parenteral or high-intensity treatment regimen, information required for actual administration of the treatment regimen in practice should be included as a separate supplemental file. The following components should be included: Drug name (chemical, generic, and brand name or names); Dose

(along with any modifications made for BMI, hematologic parameters, renal function, or other factors); Route (if parenteral, is central venous access required?)

Type and volume of diluent if drug is not given IV push direct from vial; rate of administration; Cycle length and number of cycles, or criteria for discontinuation; Premedications and concurrent medications (including hydration, anti-emetics, growth factors, or any other relevant supportive medications); Patient-monitoring parameters (frequency of visits and blood draws during therapy);

Acknowledgments

Support received from individuals, organizations, grants, corporations, and/or any other sources must be acknowledged. For work involving a biomedical product or potential product partially or wholly supported by corporate funding, a note must be included stating: This study was supported (in part) by research funding from [company name] to [author's or authors' initials]. Grant support, if received, needs to be stated and the specific granting institution(s) name(s) and grant numbers provided when applicable. Any individuals involved in the writing/editing/researching of the paper not named as authors should be identified, their role specified, and their funding source specified; for example, "Joseph Smith, a medical writer supported by funding from [company name], provided drafts and editorial assistance to the authors during preparation of this manuscript." Prior to submission of the manuscript, we recommend that authors notify all individuals being included in the acknowledgments section to ensure their names and roles are being identified accurately.

Authorship and conflict-of-interest statements

For each author, include in this section his or her category of contribution and list any potential conflicts of interest. These statements will be printed and posted online in the First Edition and in the final version in the Authorship section.

If the author(s) declare no competing financial interests, this must be explicitly stated and will be included in all versions of the article. Contributions and COI must appear both in the metadata and in the manuscript text.

References

Include references in numerical order at the end of the article according to the order of citation in the manuscript text. Text citations of reference should consist of superscript numbers. Format references per the instructions of the Blood Style Guide. If you use citation software, check it carefully to ensure that it formats your references according to the current Blood style.

Authors can now have Medline links in their HTML references for citations that have only been published via prepublication in Blood First Edition or in other prepublished articles. Since prepublished articles have PubMed records and a PubMed ID (PMID) is listed at the bottom of every PubMed record as the citation identifier, an author can include the PMID within his or her manuscript references to link the prepublication citation to its PubMed record. Citation of a paper prepublished in First Edition must also include its DOI number, as shown in the prepublished article.

Footnotes and abbreviations

Do not use footnotes; instead, sparingly use parenthetical statements within text. Abbreviations should be defined at first mention and thereafter applied consistently throughout the article. Do not use nonstandard abbreviations or abbreviate terms appearing fewer than three times. Give the chemical name of a compound after the first use of the common name. The common name may be used throughout the article. Abbreviate units of measure only when used with numbers. See the Blood Style Guide for more information.

Figures

When submitting a manuscript for review, image file formats accepted for uploading include: GIF, JPEG (.jpg), PDF, TIFF, and EPS. PowerPoint (.ppt) files are acceptable but are strongly discouraged due to conversion issues and poor resolution in the published article.

High-resolution image files are not preferred for initial submission as the file sizes may be too large. The total file size of the PDF for peer review should not exceed 5 MB. However, high-resolution figures are required for accepted articles entering into prepublication and print production. To prepare print-quality figures, see Figure preparation and sizing for the final print publication. Detailed instructions for submitting digital artwork can be found at [Digital artwork for production in Blood](#).

Note that no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. If groupings of images from different parts of the same gel or microscopic field, or from different gels, fields, or exposures are used, they must be made explicit by the arrangement of the figure (i.e., by inserting black dividing lines) and in the text of the figure legend, explaining what steps were taken to produce the final image and for what reason. Adjustments of brightness, contrast, or color

balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure, eliminate, or misrepresent any information present in the original, including backgrounds. Without background information, it is not possible to evaluate how much of the original gel is shown. Nonlinear adjustments (e.g., changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend. The use of special software tools (e.g., erasing, cloning) available in popular image-editing software is strongly discouraged unless absolutely necessary, and any such manipulations must be explained in the figure legend.

All images in Figures and Supplemental information from manuscripts accepted for publication are examined for any indication of improper manipulation or editing. Questions raised by Blood staff will be referred to the Editors, who may then request the original data from the author(s) for comparison with the submitted figures. Such manuscripts will be put on hold and will not be prepublished in Blood First Edition until the matter is satisfactorily resolved. If the original data cannot be produced, the acceptance of the manuscript may be revoked.

Cases of deliberate misrepresentation of data will result in revocation of acceptance and will be reported to the corresponding author's home institution or funding agency.

Figure legends

All legends must begin with a short, descriptive sentence that summarizes the intent and content of the figure. This sentence should be in boldfaced font. A more detailed explanation of the data contained in the figure and/or its parts should follow in standard (non-boldfaced) font.

Tables

Each table should have a brief, specific, descriptive title, giving sufficient explanation to make the data intelligible without reference to the text. Number all tables and cite in numerical order in the text, using Arabic numerals.

Supplemental data

The Journal encourages the submission of supplemental data linked to primary research articles, including videos and short movies, that enhance the understanding of the science discussed in the manuscript. Supplemental data must be included during the initial submission of the parent manuscript. All supplemental data, other than videos, must be contained in a single PDF or Microsoft Word (.doc or .docx) file — not as separate files for each individual component. Do not include any supplemental data in the main manuscript text document, including appendices (e.g., lists of contributors to a consortium), methods, tables, figures, and legends of any kind. The Editors will review the supplemental material along with the manuscript, but acceptance of the manuscript does not guarantee ultimate acceptance of the supplement.

Supplemental data may or may not appear alongside an accepted article at the time of its publication in First Edition, depending on the time needed to process the supplemental material. Blood instituted a publication fee of \$105 for each standard data supplement accompanying an accepted paper. Any supplement exceeding 5 MB will incur an additional \$105 (USD) fee; exceptions are possible for certain video

files at the Editor's discretion. The fee is waived for Review Articles, How I Treat, Perspectives, and e-Blood articles. For more information, please see Supplemental data in Blood. Any information necessary for a reader to fully evaluate and understand an article must be included in the main text of a paper — not included solely in supplemental data.

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

	<p style="text-align: center;">COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p> <p style="text-align: center;">Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com</p>	 <p style="text-align: center;">Governou do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE</p>
---	---	---

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 035/2010

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme

Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra, Ph.D.

Identidade: 5867375 **CPF:** 987.061.525-20 **Telefone:** 81 – 3182-4711

Endereço: Rua. Antonio Celso Uchoa Cavalcanti- Graças- Recife – PE – CEP: 52050-002

Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE

Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade clínica da anemia falciforme.

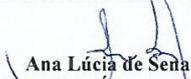
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de $\alpha_2^{3,7kb}$ talassemia e da triplicação do α ($\alpha\alpha\alpha$) influenciam nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos das Haplótipos β^S com o episódio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

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

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

Homologado na Reunião do CEP de 20/10/2010


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