



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

GABRIELA DA SILVA ARCANJO

**ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE *VDR* E SUA INFLUÊNCIA NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Recife
2020

GABRIELA DA SILVA ARCANJO

**ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE VDR E SUA INFLUÊNCIA NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Profº Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Profº Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Recife

2020

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

Arcanjo, Gabriela da Silva

Análise de variantes genéticas no gene *VDR* e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme / Gabriela da Silva Arcanjo. - 2020.

91 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

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

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Doenças hereditárias. 2. Anemia falciforme. 3. Vitamina D. I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador). II. Araújo, Antonio Roberto Lucena (coorientador) III. Título.

616.527

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-103

GABRIELA DA SILVA ARCANJO

**ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE VDR E SUA INFLUÊNCIA NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

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

Área de concentração: Genética

Aprovada em: 20/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Manuela Freire Hazin Costa (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Igor de Farias Domingos (Examinador externo)
Universidade Federal do Rio Grande de Norte – UFRN

AGRADECIMENTOS

À UFPE e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade de crescimento profissional e científico;

À Facepe pelo apoio financeiro fornecido;

Ao HEMOPE e seus funcionários pelo apoio e infraestrutura cedidos e aos pacientes com anemia falciforme, por esta instituição atendidos, que voluntariamente se dispuseram a participar desta pesquisa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos André, por toda confiança a mim depositada, pelo conhecimento compartilhado, por todas as oportunidades dadas, e pelos conselhos, preocupação e amizade construída durante este tempo;

A todos os membros do NHCL, em especial a Jéssica e ao Prof. Dr. Antonio Roberto, pelo suporte técnico, científico e principalmente pela amizade. Deixo um agradecimento especial para Aida que esteve ao meu lado em cada etapa da construção desta dissertação;

Aos meus amigos pelo apoio incondicional. A Marcondes, Rodrigo, Thaís e Thuanny pela parceria científica, risadas e momentos únicos compartilhados. A Werbson pela paciência, conversas, experiências, sorrisos e toda parceria construída durante o mestrado;

Aos meus pais, por todo apoio e enorme dedicação e sacrifício em mim investidos;

Por fim, a todos aqueles que apesar de não estarem aqui listados, contribuíram para minha formação profissional, seja dentro da universidade ou fora dela.

“O conhecido é finito, o desconhecido, infinito; intelectualmente estamos numa ilhota no meio de um oceano ilimitado de inexplicabilidade. Nossa função em cada geração é reivindicar um pouco mais de terra firme.”
(T. H. Huxley, 1887)

RESUMO

A vitamina D, por meio da ligação com seu receptor, o VDR, efetua ações que vão além do metabolismo do cálcio, e tem impacto na fisiopatologia da anemia falciforme (AF), como regulação da inflamação, tônus vascular e trombogênese. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a associação de polimorfismos no gene *VDR* com as complicações clínicas de pacientes com AF. Foi realizada a genotipagem para os polimorfismos *FokI* (rs2228570) e *Cdx-2* (rs11568820) do gene *VDR*, em 538 pacientes. Nenhuma associação foi observada entre o polimorfismo *Cdx-2* e as variáveis clínicas analisadas. Em contrapartida, indivíduos com genótipo homozigoto variante TT para o polimorfismo *FokI* apresentavam maior frequência de doença cerebrovascular (DCV) ($p=0,009$; OR: 2,7; IC 95%: 1,33 – 5,82). As análises de risco cumulativo mostraram que os pacientes com este genótipo apresentaram maior taxa de desenvolvimento de DCV (33%) quando comparado aos genótipos CT e CC (16%) em um menor intervalo de tempo ($p=0,003$). Adicionalmente, indivíduos com genótipo TT apresentaram maior frequência de Doppler transcraniano alterado em relação aos indivíduos com os outros genótipos ($p=0,007$). Avaliando os níveis de 25-hidroxivitamina D, identificamos os menores níveis em indivíduos com DCV fazendo uso de hidroxiureia e com genótipo TT para o polimorfismo *FokI*. Em resumo, esses resultados apontam o polimorfismo *FokI* do gene *VDR* como um potencial modulador de risco para complicações cerebrovasculares na AF.

Palavras-chave: 25-hidroxivitamina D. *Cdx-2*. *FokI*. Receptor da vitamina D. rs2228570.

ABSTRACT

Vitamin D, through binding to its receptor, VDR, performs actions that go beyond calcium metabolism, and has an impact on the pathophysiology of sickle cell anemia (SCA), such as regulation of inflammation, vascular tone and thrombogenesis. This study aimed to evaluate the association of polymorphisms in the *VDR* gene with the clinical complications of patients with SCA. Genotyping for *FokI* (rs2228570) and Cdx-2 (rs11568820) *VDR* gene polymorphisms was performed in 538 patients. No association was observed between Cdx-2 polymorphism and the clinical variables analyzed. In contrast, patients with TT genotype for *FokI* polymorphism had higher frequencies of cerebrovascular disease (CVD) ($p = 0.009$; OR: 2.7; 95% CI: 1.33 - 5.82). Cumulative risk analyzes showed that patients with TT genotype had a higher rate of CVD development (33%) when compared to CT and CC genotypes (16%) in a shorter time interval ($p=0.003$). In addition, patients with TT genotype had higher frequencies of abnormal transcranial Doppler ($p=0.007$). Regarding 25-hydroxyvitamin D levels, we observed the lowest levels in individuals with CVD using hydroxyurea and with TT genotype for the *FokI* polymorphism. In summary, these results indicate *FokI* polymorphism of *VDR* gene as a potential risk modulator for cerebrovascular complications in SCA.

Keywords: 25-hydroxyvitamin D. Cdx-2. *FokI*. Vitamin D receptor. rs2228570.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Número estimado de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país no ano de 2015.....	19
Figura 2 –	Principais eventos envolvidos na fisiopatologia da anemia falciforme.....	21
Figura 3 –	Diagrama da área onde o transdutor do Doppler Transcraniano é posicionado a fim de obter os sinais das artérias intracranianas.....	26
Figura 4 –	Via de síntese da Vitamina D.....	32
Figura 5 –	Mecanismo de ação do complexo VDR/Vitamina D.....	35
Figura 6 –	Organização estrutural do gene VDR e principais polimorfismos encontrados.....	37
Figura 7 –	Probabilidade cumulativa para desenvolvimento de DCV em pacientes com AF de acordo com os genótipos para o polimorfismo <i>FokI</i>	52
Figura 8 –	Avaliação dos níveis de 25(OH)D sérica de acordo com os polimorfismos <i>FokI</i> e <i>Cdx-2</i> do gene VDR.....	54
Figura 9 –	Análise dos níveis de 25(OH)D com o tratamento ou não com hidroxiuréia (HU).....	54
Figura 10 –	Análise dos níveis de 25(OH)D sérica em pacientes com AF de acordo com o polimorfismo <i>FokI</i> (rs2228507).....	55
Quadro 1 –	Exemplos de genes responsivos ao complexo vitamina D/VDR com expressão regulada positivamente ou negativamente e suas respectivas vias.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Descrição das principais complicações clínicas de pacientes com AF.....	24
Tabela 2 –	Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo...	47
Tabela 3 –	Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo.....	48
Tabela 4 –	Frequências alélicas e genóticas dos SNPs estudados na população.....	49
Tabela 5 –	Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo <i>FokI</i> , de acordo com modelo de herança recessivo.....	50
Tabela 6 –	Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF com os níveis de 25(OH)D.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
$\alpha^{3,7\text{kb}}$	Deleção $\alpha^{3,7\text{kb}}$
β	Beta
β^S	Cadeia globínica beta com alteração para a formação da Hb S
γ	Gama
1,25(OH) ₂ D	1,25-diidroxivitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
7-DHC	7-dehidrocolesterol
AF	Anemia Falciforme
ARB	Árabe-Indiano
AVE	Acidente vascular encefálico
BEM	Benin
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CAR	República Central Africana
CDX-2	Fator de transcrição homeobox 2 tipo caudal
CSSCD	Do inglês, <i>Cooperative study of sickle cell disease</i>
CVO	Crise vaso-oclusiva
DAMP	Do inglês <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DBP	Do inglês, <i>Vitamin D binding protein</i>
DCV	Doença cerebrovascular
DF	Doença falciforme
DMO	Densidade mineral óssea
DTC	Doppler transcraniano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
FGF-23	Do inglês, <i>Fibroblast growth factor 23</i>
GM-CSF	Do inglês, <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GWAS	Do inglês, <i>Genome-Wide Association Study</i>
Hb A	Hemoglobina A

Hb AS	Indivíduo traço falciforme
Hb F	Hemoglobina Fetal
Hb S	Hemoglobina S
Hb S/ β^0	S/ β^0 talassemia
HBB	Gene da β globina
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Do inglês, <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LabCen	Laboratório Central
LDH	Lactato desidrogenase
MAF	Do inglês, <i>minor allele frequency</i>
mRNA	RNA mensageiro
NET	Do inglês, <i>Neutrophil extracellular trap</i>
NF- κ B	Do inglês, <i>factor nuclear kappa B</i>
ON	Óxido Nítrico
PAI-1	Do inglês, <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PTH	Paratormônio
q	Braço longo do cromossomo
RBC	Do inglês, <i>Red blood cells</i>
RFLP	Do inglês, <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
RXR	Do inglês, <i>Retinoic X receptor</i>
SEA	Sequestro esplênico agudo
SEM	Senegal
SNP	do inglês, <i>Single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome torácica aguda
STOP	do inglês, <i>Stroke prevention trial in sickle cell anemia</i>
TC	Tomografia computadorizada
TLR4	Do inglês, <i>Toll like receptor 4</i>
VCAM-1	Do inglês, <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>

VCM	Volume corpuscular médio
VDD	Deficiência de vitamina D
VDR	Do inglês, <i>Vitamin D receptor</i>
VDREs	Do inglês, <i>Vitamin D response elements</i>
VMMF	Velocidade máxima de fluxo
VWF	Do inglês, <i>von Willebrand factor</i>
WBC	Do inglês, <i>White blood cells</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	ANEMIA FALCIFORME.....	18
2.1.1	Etiologia e epidemiologia.....	18
2.1.2	Fisiopatologia.....	20
2.1.3	Complicações Clínicas.....	23
2.1.4	Tratamento.....	27
2.2	MODULADORES GENÉTICOS.....	29
2.2.1	Vitamina D.....	31
2.2.2	Receptor da Vitamina D (VDR).....	34
2.2.3	Polimorfismos genéticos no gene VDR.....	36
2.2.3.1	Polimorfismo FokI.....	38
2.2.3.2	Polimorfismo Cdx-2.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	43
3.2	DEFINIÇÃO DOS GRUPOS.....	43
3.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	44
3.4	DOSAGEM DA 25(OH)D SÉRICA.....	44
3.5	ANÁLISE MOLECULAR.....	45
3.5.1	Extração de DNA genômico.....	45
3.5.2	Genotipagem dos polimorfismos do gene VDR.....	45
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46

4	RESULTADOS.....	47
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA COORTE.....	47
4.2	GENOTIPAGEM DOS SNPS DO GENE VDR.....	49
4.3	ASSOCIAÇÃO DOS SNPS DO GENE VDR COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA AF.....	50
4.4	ASSOCIAÇÃO DA 25-HIDROXIVITAMINA D COM AS VARIÁVEIS CLINICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES E OS SNPS DO GENE VDR.....	53
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	80
	ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	81
	ANEXO C – TABELA SUPLEMENTAR 1.....	85
	CURRICULUM VITAE (LATTES).....	87

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF), doença hereditária monogênica mais comum no mundo, é causada pela homozigose de uma mutação pontual no gene da globina β (*HBB*), a qual leva à substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina no 6º códon da cadeia β globínica, resultando na formação de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (Hb S). Sob condições de hipóxia, a Hb S se organiza na forma de polímeros e precipita, causando alterações morfológicas na hemácia, resultando, por fim, na sua falcização. A doença é caracterizada por um quadro inflamatório crônico, no qual a liberação de citocinas inflamatórias, adesão de leucócitos, plaquetas e hemácias ao endotélio vascular contribuem para sua fisiopatologia. Em conjunto, esses eventos levam à oclusão de vasos na microcirculação, seguido por isquemia e infarto tecidual. A ocorrência desses eventos, juntamente com a hemólise, compõe um conjunto de fatores fisiopatológicos determinantes da grande maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes com AF.

As principais complicações clínicas desses pacientes incluem crises de dor, priapismo, síndrome torácica aguda, osteonecrose, úlceras maleolares, insuficiência renal, dactilite, sequestro esplênico e acidente vascular encefálico (AVE), sendo essas três últimas mais recorrentes em crianças. Entretanto, os pacientes com AF apresentam grande variabilidade clínica, e, por este motivo, a investigação de moduladores genéticos relacionados com a fisiopatologia da doença, podem auxiliar na investigação da susceptibilidade de indivíduos portadores de AF quanto à proteção ou risco de desenvolvimento de complicações clínicas.

Neste contexto, o gene do receptor da vitamina D (*VDR*) é um interessante candidato para investigação genética, uma vez que polimorfismos neste gene podem levar a alterações nos mecanismos de ação da vitamina D. A vitamina D é um hormônio esteroide lipossolúvel que tem funções importantes em diversas atividades fisiológicas, como a regulação do sistema imunológico, regulação da inflamação, além da sua conhecida ação no metabolismo do cálcio. Estudos demonstram que a deficiência de vitamina D pode resultar em um estado pró-inflamatório exacerbado, com maior liberação de interleucinas. As ações da vitamina D são mediadas via ligação com seu receptor específico o VDR, que é um receptor nuclear, que atua como um fator de transcrição dependente de ligante. O VDR é expresso em diversos tipos celulares e parece participar, direta ou indiretamente, da

regulação de cerca de 3% do genoma humano.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) no gene *VDR* podem afetar a função deste receptor e, por consequência, a ação da Vitamina D. Dois dos SNPs frequentemente estudados (*FokI* e *Cdx-2*) têm sido associados a distúrbios ósseos, doenças autoimunes, doença vascular, câncer e outras patologias. Entretanto, na anemia falciforme esta relação ainda é pouco estudada. Dessa forma, devido à presença do *VDR* em diversos órgãos e seu papel em mecanismos importantes para a fisiopatologia da AF, como inflamação, disfunção endotelial, estresse oxidativo e coagulação, é possível que variantes polimórficas de impacto funcional para o *VDR* (*FokI* e *Cdx-2*), poderiam perturbar as ações da vitamina D e influenciar no agravamento de complicações clínicas da AF.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a possível associação dos polimorfismos *FokI* e *Cdx-2* do *VDR* e os níveis séricos da 25(OH)D com as complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme acompanhados pelo ambulatório da Fundação HEMOPE.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Determinar as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *FokI* (rs2228570) e *Cdx-2* (rs11568820) do gene *VDR*, em pacientes com anemia falciforme;
2. Verificar a existência de associação entre as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos *FokI* e *Cdx-2* com as variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes estudados;
3. Avaliar os níveis séricos da 25(OH)D em pacientes com anemia falciforme e relacionar com as variáveis clinico-laboratoriais e os genótipos dos polimorfismos *FokI* e *Cdx-2*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Etiologia e epidemiologia

Mais de 100 anos se passaram desde a publicação do primeiro caso de anemia falciforme (AF) em um jovem de descendência africana com hemácias peculiarmente alongadas e com formato de foice (HERRICK, 1910). Os anos seguintes foram marcados por um número progressivo de relatos da AF e diversos avanços na elucidação das bases moleculares da doença (SERJEANT, 2010). De fato, tais avanços levaram Linus Pauling e colaboradores em 1949 à descoberta do padrão de migração eletroforético diferenciado entre a hemoglobina S e a hemoglobina A, culminando no nascimento do conceito de doença molecular, sendo a AF o primeiro exemplo descrito (PAULING et al., 1949).

A hemoglobina S (Hb S) é uma variante estrutural patológica da hemoglobina normal do adulto (Hb A) que resulta de uma mutação pontual no gene da β -globina (*HBB*), localizado no cromossomo 11p15.15. Esta alteração molecular consiste na substituição da base nitrogenada adenina por timina no sexto códon do gene *HBB*, levando à troca de um resíduo de ácido glutâmico hidrofílico por um resíduo de valina hidrofóbico com conseqüente mudança na molécula de hemoglobina (*HBB*, glu6val, rs334) (FRENETTE; ATWEH, 2007; STEINBERG et al., 1995).

O termo doença falciforme (DF) é utilizado para definir um grupo de desordens genéticas, caracterizadas pela presença da hemoglobina S. A AF, doença autossômica recessiva caracterizada pela homozigose da Hb S, é a forma mais comum e grave representando cerca de 70% dos casos de DF (PIEL et al., 2010). Outras formas de DF compreendem casos de heterozigotos compostos onde há associação da Hb S com outra hemoglobina variante (por exemplo, Hb C, Hb D) ou com a beta talassemia (Hb S/ β^+ talassemia e Hb S/ β^0 talassemia), condições na qual a gravidade é variável. Em heterozigose (Hb AS) os indivíduos são assintomáticos e apresentam condição conhecida com traço falciforme (STEINBERG, 2008; WARE et al., 2017).

De acordo com dados da análise sistemática do estudo de Carga Global de Doença (*Global Burden of Disease - GBD*), 3.2 milhões de pessoas vivem com DF,

43 milhões de pessoas são portadoras do traço falciforme e 176.000 pessoas morrem por ano devido a complicações decorrentes da doença (GBD MORTAL. CAUSES DEATH COLLAB., 2015). Estimativas apontam que, por ano, aproximadamente 300.000 indivíduos nascam com AF (Figura 1) no mundo e este número pode chegar a 400.000 nascimentos no ano de 2.050 (PIEL et al., 2013).

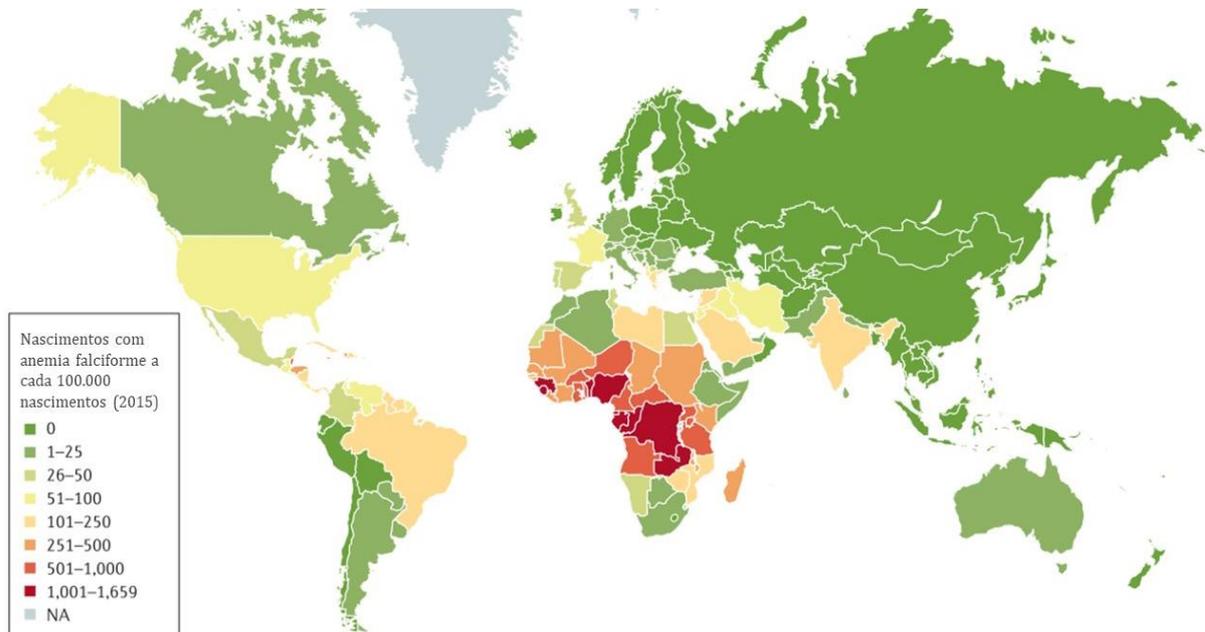


Figura 1: Número estimado de nascimentos de indivíduos com anemia falciforme por 100.000 nascimentos por país no ano de 2015. Adaptado de Kato et al. (2018).

A prevalência da AF é alta em regiões da África, do Oriente Médio, do Mediterrâneo e da Índia devido à proteção que a heterozigose para a Hb S (Hb AS) confere contra o parasita *Plasmodium falciparum* causador da malária (PIEL et al., 2010). Entretanto, o comércio de escravos e os movimentos migratórios populacionais favoreceram a distribuição do alelo β^S muito além das suas regiões de origem (PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Grande parte dos africanos forçados a migrar para as Américas foram distribuídos para os Estados Unidos e regiões da América Latina, principalmente o Brasil e Caribe (HUTTLE et al., 2015).

No Brasil estima-se que existam entre 25.000 e 30.000 indivíduos com AF e cerca de 7 milhões de portadores (Hb AS), levando ao nascimento de aproximadamente 3.500 crianças com AF a cada ano (CANÇADO; JESUS, 2007). Considerada como um problema de saúde pública no Brasil, a AF tem alta prevalência em afrodescendentes, os quais, em alguns casos, fazem parte de grupos menos favorecidos socialmente (CRISTINA et al., 2018; SANTOS; GOMES NETO, 2013). A prevalência da doença varia acentuadamente de acordo com as

diferentes regiões do país, refletindo a variabilidade étnica da população. No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 7.000 nasce com a doença falciforme (Brasil, 2013).

Devido à prevalência e gravidade da doença, em 2001 o Ministério da Saúde, mediante a portaria nº 822/01, determinou que a pesquisa de hemoglobinopatias fosse realizada como parte do Programa de Triagem Neonatal, facilitando o diagnóstico precoce e assim contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (LOBO et al., 2014).

2.1.2 Fisiopatologia

A anormalidade estrutural da Hb S é responsável pelo desencadeamento das complicações clínicas nos indivíduos com doença falciforme. Na presença de algumas condições como desoxigenação, as moléculas de Hb S estabelecem interações intermoleculares hidrofóbicas, que irão promover a sua polimerização, resultando em uma série de alterações morfológicas e funcionais dos eritrócitos, tornando-os falcizados (SONATI; COSTA, 2008). Ciclos de polimerização e despolimerização causam danos ao citoesqueleto da membrana eritrocitária, tornando as células irreversivelmente falcizadas (STEINBERG, 2008; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Esta alteração modifica as propriedades da membrana celular, reduzindo sua flexibilidade além de promover maior aderência ao endotélio vascular (ZHOU; BEHYMER; GUCHHAIT, 2011).

Estudos de cinética da polimerização da Hb S demonstraram que a formação do polímero é de ordem exponencial em função da quantidade dessa hemoglobina, demonstrando o papel crucial da sua concentração no fenômeno da falcização (DE FRANCESCHI et al., 2011; VEKILOV, 2007). Além da concentração intra-eritrocitária de Hb S, o fenômeno de falcização depende, do grau de desoxigenação da célula, pH, concentração intracelular de Hb fetal (Hb F) e temperatura (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; LONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001). A polimerização da Hb S está também associada com uma redução de água e íons celulares (desidratação) e aumento da densidade do eritrócito, com consequente aceleração da formação do polímero. (DE FRANCESCHI et al., 2011; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). A polimerização das moléculas de Hb S no interior das hemácias falcizadas culmina então em lesão celular. Em larga escala, eritrócitos

danificados favorecem os eventos hemolíticos e vaso-oclusivos, caracterizando os fenótipos da AF (STEINBERG, 2008) (Figura 2).

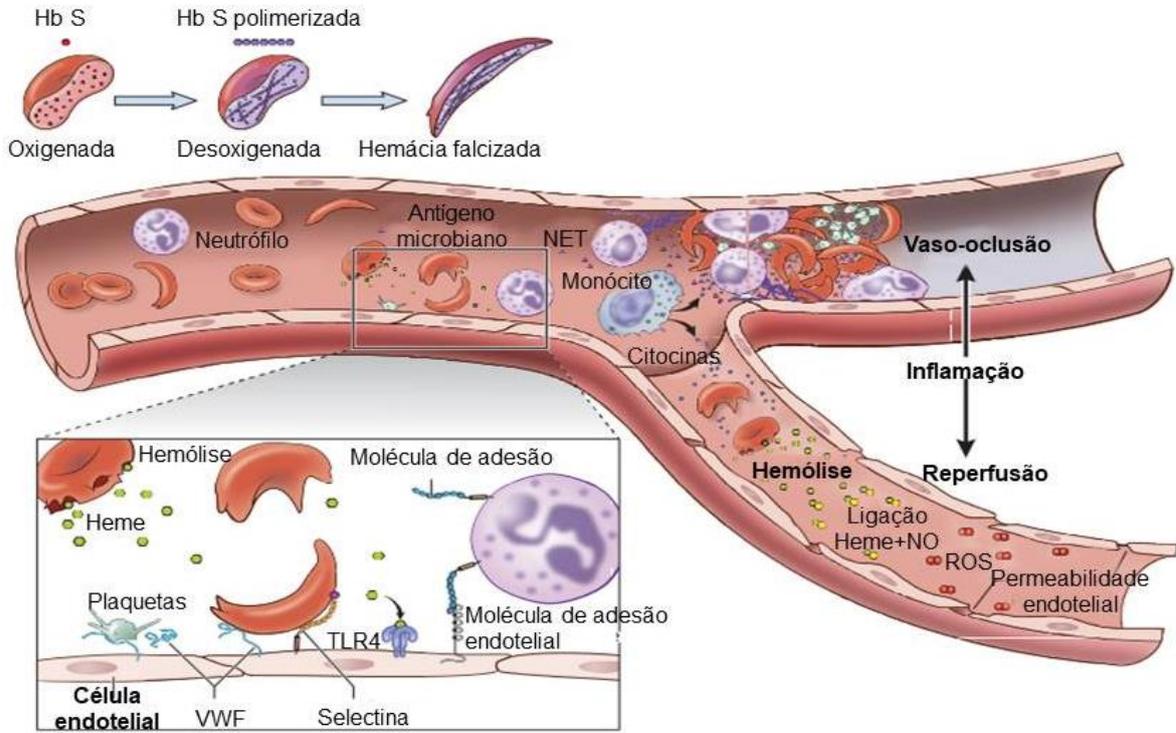


Figura 2: Principais eventos envolvidos na fisiopatologia da anemia falciforme. A polimerização da desoxi-HbS leva à formação de eritrócitos desidratados e deformados. As células falcizadas desencadeiam a oclusão microvascular através de interações com neutrófilos e plaquetas ativadas e adesão ao endotélio vascular, levando à isquemia e hipóxia tecidual, seguida por vasodilatação e lesão de reperfusão. Devido à hemólise há liberação de hemoglobina com consequente oxidação pelo heme. O heme funciona como um padrão molecular associado a danos que ativa as células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de NETs via ligação com o TLR4. NET: *neutrophil extracellular trap*, ROS: Espécies reativas do oxigênio, VWF: fator de von Willebrand, TLR4: receptor do tipo Toll 4 (Adaptado de Williams and Thein 2018).

Os eventos vaso-oclusivos característicos da AF na microcirculação resultam de um cenário complexo, que envolve interações entre os eritrócitos falcizados e outros componentes do sistema circulatório (PLATT, 2008). A hemácia falcizada apresenta a composição lipídica da sua membrana significativamente alterada, levando à maior exposição de fosfatidilserina negativamente carregada na monocamada lipídica externa. Essa mudança promove uma maior adesão dessas hemácias, além de aumentar a conversão de pró-trombina em trombina levando ao aumento da taxa de eventos trombóticos (AZAR; WONG, 2017).

A ativação do endotélio vascular leva à produção e liberação de várias moléculas inflamatórias potentes, incluindo as citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), IL-8, IL-6, o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF, do

inglês, *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1, do inglês, *Plasminogen activator inhibitor-1*), que contribuem para o ambiente pro-inflamatório da AF (CONRAN; BELCHER, 2018). Além disso, a interação da hemácia falcizada com o endotélio vascular, produz radicais livres de oxigênio pelas células endoteliais e a ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes que expressam moléculas de adesão como a E-selectina, molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, do inglês, *Vascular cell adhesion protein 1*), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, do inglês, *Intercellular adhesion molecule 1*) na superfície do endotélio e seus níveis plasmáticos aumentam com a permanência da ativação endotelial (FRENETTE; ATWEH, 2007). Aliado a isso, a presença de leucócitos aderentes na microcirculação sugere fortemente que essas células, devido ao seu volume celular, são importantes contribuintes para a desaceleração circulatória (ODIÈVRE et al., 2011; ZHANG et al., 2016). Esse panorama descrito produz, então, um ambiente inflamatório, com ativação de leucócitos e plaquetas circulantes e aumento de citocinas pró-inflamatórias, culminando, por fim, em episódios de vaso-occlusão, seguido por isquemia e infarto em vários tecidos (BISWAL et al., 2018).

Na AF, a hemólise ocorre extra vascularmente pelo reconhecimento das hemácias danificadas por células do sistema reticulo endotelial. Além disso, o agrupamento da proteína de membrana banda 3, leva ao acúmulo anormal de imunoglobina G e complemento na superfície dos eritrócitos, o que, por sua vez, pode levar à destruição intravascular de hemácias mediada pelo complemento (AZAR; WONG, 2017; ODIÈVRE et al., 2011). A hemólise intravascular é responsável por aproximadamente 30% da hemólise total de um paciente com AF (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

A regulação do tônus vascular normal depende de um equilíbrio entre mediadores produzidos pelo endotélio, como a endotelina-1 (ET-1), com sua ação vaso-constrictiva e óxido nítrico (ON), com sua atividade vasodilatadora (MORRIS, 2011; ODIÈVRE et al., 2011). Devido à hemólise crônica, pacientes com AF apresentam altos níveis de hemoglobina plasmática que, por sua vez, sequestram o ON, diminuindo sua disponibilidade, contribuindo, assim, para a vasoconstrição (REES; GIBSON, 2012).

A hemoglobina livre é ainda oxidada liberando o heme, que é um importante padrão molecular associado a danos (DAMP, do inglês *Damage-associated*

molecular patterns) (CONRAN; BELCHER, 2018). O heme promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4, do inglês, *Toll like receptor*), geração de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) e liberação de mais DAMPs derivados de tecidos ou células (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). O heme livre pode contribuir para a inflamação estéril, ativando o inflamassoma NLRP3 nas células vasculares e inflamatórias com consequente liberação de IL-1 β (NYAKUNDI et al., 2019; PITANGA et al., 2016). Finalmente, a inflamação estéril promove ainda mais a vaso-occlusão por meio da ativação contínua da adesão de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Assim, a ocorrência de eventos vaso-oclusivos, principalmente em pequenos vasos, juntamente com a hemólise, compõe um conjunto de eventos fisiopatológicos determinantes da grande maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes com AF (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017).

2.1.3 Complicações Clínicas

O Programa dos Centros de Compreensão da Doença Falciforme, em 2005, teve como um dos seus resultados uma nova categorização das complicações clínicas da AF, dividindo-as em 12 categorias de acordo com o sistema e/ou órgão acometido, contidas em 03 grandes grupos maiores (BALLAS et al., 2010). Estes resultados estão sumarizados na tabela 1.

As complicações clínicas da AF variam significativamente de um indivíduo para outro; desde pacientes sem muitas intercorrências clínicas àqueles com múltiplos eventos (AZAR; WONG, 2017). Além disso, determinadas complicações da doença tendem a se manifestar em faixas etárias distintas. Nas primeiras décadas da vida, as complicações clínicas mais recorrentes são os episódios dolorosos oriundos das crises vaso-oclusivas, a síndrome torácica aguda e o acidente vascular encefálico, contudo estes eventos não são restritos a esta faixa etária, podendo vir a ocorrer ao longo da vida (STEINBERG, 2008).

Tabela 1: Descrição das principais complicações clínicas de pacientes com AF. (Adaptado de Ballas et al. 2010)

Grupo I. Complicações hematológicas e suas sequelas
Exacerbação aguda da anemia
Hiperhemólise
Crise aplásica
Grupo 2. Síndromes de dor da doença falciforme e complicações correlatas
Síndromes de dor
Episódios de vaso-oclusão
Grupo 3. Complicações que afetam órgãos maiores
Complicações neurológicas
Acidente vascular encefálico (AVE) – Isquêmico ou hemorrágico
Síndrome Moya-Moya
Infarto cerebral silencioso
Velocidade elevada no Doppler transcraniano (DTC)
Ataque isquêmico transitório
Complicações oftalmológicas
Retinopatia
Complicações cardíacas
Cardiomegalia
Hipertensão arterial sistêmica
Complicações pulmonares
Síndrome torácica aguda
Complicações gastrointestinais/ hepatobiliares
Colelitíase
Complicações renais/ geniturinárias
Insuficiência renal crônica
Priapismo
Complicações esplênicas
Sequestro esplênico agudo
Complicações musculares/ esqueléticas/ cutâneas
Osteonecrose ou necrose avascular
Dactilite ou Síndrome de mão-pé
Úlceras de perna
Distúrbios do crescimento e desenvolvimento
Infecções recorrentes

Dentre as complicações clínicas da doença, as crises vaso-oclusivas (CVO), ou crises de dor, são as mais prevalentes e aparecem como a principal causa de admissão hospitalar dentre os pacientes com AF (STEINBERG, 1999). Episódios de oclusão de vasos da microcirculação, especialmente vasos localizados na região medular dos ossos, periósteo e músculos profundos, podem causar infarto tecidual e necrose. Como resultado, o aumento de mediadores inflamatórios leva à ativação de nociceptores que inervam estes tecidos, ocasionando os episódios de dor (BALLAS et al., 2010; STUART; NAGEL, 2014). As crises de dor frequentemente se iniciam na infância afetando pequenos ossos das mãos e dos pés em um episódio chamado dactilite, que além da dor, é caracterizada por edema, eritema e aumento da

temperatura local (JUNIOR; DAHER; ROCHA, 2012; MEIER; MILLER, 2012). A dactilite ou “síndrome de mão-pé” afeta crianças menores de 04 anos de idade, visto que em indivíduos com idades mais avançadas, o tecido hematopoiético dessas regiões é substituído por tecido conectivo fibroso e gordura (SOLÉ-RIBALTA et al., 2015).

Seguido das crises de dor comuns, a síndrome torácica aguda (STA) é uma complicação pulmonar, que representa a segunda maior causa de internamento dos pacientes com AF, sendo associada a altas taxas de mortalidade e morbidade (JAIN; BAKSHI; KRISHNAMURTI, 2017). O termo STA foi primeiramente usado por Charache et al. (1979) para descrever indivíduos com AF que apresentavam simultaneamente febre, dor torácica, infiltrado pulmonar e leucocitose (CHARACHE; SCOTT; CHARACHE, 1979). Por definição, a STA é caracterizada pela presença de novo infiltrado pulmonar evidenciado pela radiografia de tórax, acompanhado de febre e sintomas respiratórios (DESAI; ATAGA, 2013). Embora apresente fisiopatologia complexa e multifatorial, os principais mecanismos apontados na sua gênese incluem: fenômeno de vaso-oclusão na vasculatura pulmonar, embolia gordurosa pulmonar, atelectasia e infecções mais comumente causadas por microrganismos do gênero *Chlamydia* e *Mycoplasma* (BOPP et al., 2018; PATTERSON et al., 2018; VICHINSKY et al., 2000)

Outra complicação frequente é a doença cerebrovascular, que se caracteriza desde o Doppler Transcraniano de alto risco até o acidente vascular encefálico, sendo esta última a de maior gravidade. De todas as complicações clínicas observadas em pacientes com AF, o acidente vascular encefálico (AVE) representava, anteriormente às condutas de prevenção, aquela de maior impacto em suas vidas, abrangendo cerca de 20% da mortalidade desses indivíduos (Adams 2014). O AVE isquêmico é comumente descrito como um evento neurológico agudo, secundário à estenose e oclusão de artérias cerebrais, resultando em isquemia tecidual, levando a manifestação de sinais e sintomas neurológicos por pelo menos 24 horas (ADAMS; OHENE-FREMPONG; WANG, 2001; FAROOQ; TESTAI, 2019; OHENE-FREMPONG et al., 1998). Em pacientes com AF, o AVE isquêmico ocorre geralmente nas grandes artérias do polígono de Willis, onde as artérias cerebrais médias, cerebrais anteriores e carótida interna estão frequentemente associadas a esse desfecho (BREWIN; KAYA; CHAKRAVORTY, 2017; SWITZER et al., 2006). Crianças com AF possuem um risco 300 vezes maior de desenvolver um AVE do

que crianças sem AF, fazendo da AF a causa mais comum de AVE na infância (HOPPE, 2005).

Em 1998, Adams e colaboradores propuseram, através do estudo *STOP* (do inglês, *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia, STOP trial*), a utilização do Doppler Transcraniano (DTC) como ferramenta de triagem e estratificação clínica para a prevenção primária ao AVE em crianças com AF (Hb SS) e S/ β^0 talassemia (Hb S/ β^0), sendo possível a identificação de pacientes com risco elevado para o desenvolvimento desta complicação (ADAMS et al., 1998). Essa triagem consiste em um exame por ultrassonografia, não invasivo, indolor e de baixo custo, capaz de estimar a média da velocidade máxima de fluxo (VMMF) sanguíneo nas artérias intracranianas do polígono de Willis (Figura 3) (ADAMS, 2004; ENNINFUL-EGHAN et al., 2010). É importante destacar que a avaliação do DTC é mais efetiva quando realizada em indivíduos até os 16 anos, devido à presença de ossos cranianos menos espessos e janelas acústicas maiores (VERLHAC, 2011).

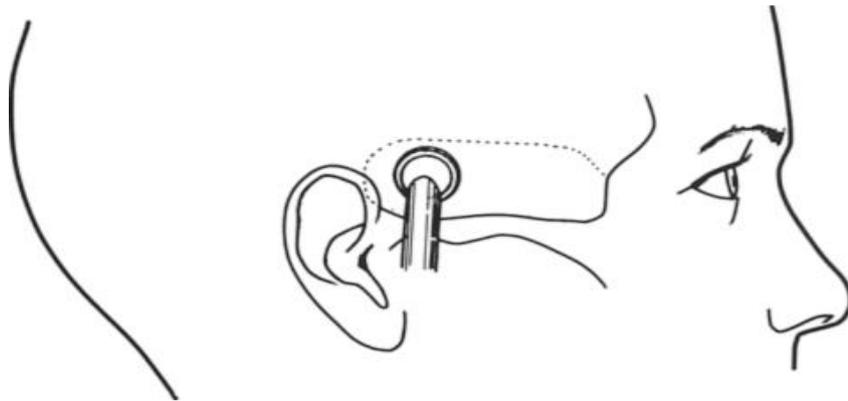


Figura 3: Diagrama da área onde o transdutor do Doppler Transcraniano é posicionado a fim de obter os sinais das artérias intracranianas (AASLID; MARKWALDER; NORNES, 1982).

Pacientes submetidos a esse exame podem ser classificados em três grupos distintos de acordo com a VMMF. A VMMF é considerada normal até 170 cm/s em pacientes com AF (sendo menor ainda em indivíduos saudáveis), condicionante quando a VMMF é igual ou superior a 170 cm/s até 199 cm/s, e alto risco, quando em duas avaliações seguidas e independentes, as VMMF são iguais ou superiores a 200 cm/s (RANKINE-MULLINGS et al., 2018). Crianças com AF e com DTC de alto risco apresentam um risco 44 vezes maior de desenvolver AVE que pacientes com de AF e DTC normal (ADAMS et al., 1992; GUILLIAMS; FIELDS; DOWLING, 2019). Entretanto pacientes que apresentam DTC na faixa condicionante também

apresentam um elevado risco de desenvolver AVE e cerca de 19% das crianças com DTC normal também podem vir a desenvolver AVE (ADAMS, 2004).

Outra complicação da AF de graves consequências é o sequestro esplênico agudo (SEA), que na maioria dos casos é a primeira complicação a se manifestar na infância (EMOND et al., 1985). O SEA é definido como o aumento rápido do volume do baço, com subsequente queda dos níveis de hemoglobina (valores em torno de 2g/dL) e contagem de reticulócitos normal. Os eventos de falcização e vaso-oclusão nos sinusóides esplênicos, favorecidos pela relativa acidez e hipóxia local, levam ao aprisionamento de hemácias e outros componentes do sangue no baço, com consequente diminuição do volume sanguíneo circulante, que, caso não repostos por meio de transfusão, leva ao choque hipovolêmico que pode causar a morte (BALLAS et al., 2010; BROUSSE et al., 2012). Além dos eventos vaso-oclusivos com consequências agudas, pequenos infartos teciduais repetidos podem, com tempo, causar um quadro de hipoesplenismo funcional com diminuição gradual das funções imunológicas do baço, favorecendo a ocorrência de infecções (BALLAS et al., 2010; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

O priapismo é caracterizado como uma condição patológica em que ocorre ereção peniana dolorosa sem estímulo ou desejo sexual. Caso esta condição não seja amenizada dentro de 4 a 6 horas, pode causar danos irreversíveis, como necrose do tecido erétil e fibrose (ARDUINI; TROVÓ DE MARQUI, 2018). Anele e colaboradores sugerem que até 89% dos pacientes com AF do sexo masculino terão esta manifestação até os 20 anos de idade, sendo classificada como a complicação renal/geniturinária mais comum em indivíduos AF do sexo masculino (ANELE et al., 2018). Por fim, além das complicações supracitadas, pacientes com AF, podem vir a desenvolver, embora com frequências reduzidas devido ao aumento do risco com idade, complicações como colelitíase, necrose asséptica de cabeça de fêmur, cardiopatias, nefropatias e úlceras de membros inferiores (STEINBERG, 2008).

2.1.4 Tratamento

Atualmente três abordagens terapêuticas têm sido utilizadas para modificar o curso da doença na AF: transfusão de eritrócitos, uso da hidroxycarbamida e transplante de células-tronco hematopoiéticas (KATO et al., 2018). As transfusões sanguíneas aumentam a concentração de HbA e reduzem a concentração de HbS

através da diluição do sangue do paciente pelas hemácias do doador. A redução da HbS ou o aumento da concentração total de Hb, ou ambos, trazem efeitos benéficos para os pacientes uma vez que antagonizam os efeitos hemolíticos da doença (BUNN, 1997; ADAMS et al., 1998). A terapia com transfusão também suprime a produção endógena de eritropoetina reduzindo posteriormente a formação de novas hemácias contendo HbS (AZAR; WONG, 2017). Assim, a determinação da frequência das transfusões depende então da avaliação da concentração total de hemoglobina do paciente, porcentagem de HbS, contagem de reticulócitos, além dos níveis de ferritina sérica, uma vez que existe o risco de sobrecarga de ferro aliado a terapia de transfusões crônicas (AZAR; WONG, 2017).

O estudo STOP validou a terapia de transfusão crônica, ou de hipertransfusão, de sangue para prevenção primária de AVE em crianças com DTC de alto risco. A terapia de transfusão administrada a cada 3-5 semanas com o intuito de diminuir e manter a quantidade de HbS para abaixo de 30%, reduziu o risco de AVE em 90% das crianças com velocidades do DTC elevadas (ADAMS et al., 1998). Assim, após o STOP II, recomenda-se a terapia de transfusão sem interrupção para todas as crianças com resultados de DTC anormalmente elevados, o que previne a ocorrência do AVE primário e também previne a possibilidade de acontecer o AVE secundário. Apesar de benéfico, a terapia de transfusões crônicas ainda é associada a algumas complicações como a sobrecarga de ferro e aloimunização (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Outra abordagem terapêutica é o uso da hidroxuréia (HU). A HU, ou hidroxycarbamida, é um agente citostático leve utilizado em doenças onco-hematológicas, que foi aprovada no Brasil como tratamento da AF em 2002 (ELFORD, 1968; BRASIL, 2002). A HU é um inibidor da fase S do ciclo celular que possui a capacidade de aumentar a produção de hemoglobina fetal, em células progenitoras eritróides. Uma vez que a HbF inibe a polimerização intracelular da HbS e que uma maior quantidade de HbF está associada à redução da morbidade e mortalidade em indivíduos com AF, a indução farmacológica da produção da HbF é um ponto promissor para tratamento da AF (WARE, 2010; WARE; AYGUN, 2009).

Assim a administração da HU em pacientes com anemia falciforme possui múltiplos benefícios, que incluem: Aumento da liberação do óxido nítrico, diminuição da adesividade, indução da síntese de HbF, com concomitante aumento na concentração de Hb total e redução da taxa de hemólise (KATO; GLADWIN;

STEINBERG, 2007). O uso desse fármaco melhora a deformabilidade das hemácias, reduz a fração de células falcizadas e está associada a melhorias na reologia e na sobrevivência das hemácias, além de reduzir os números de leucócitos circulantes, reticulócitos e plaquetas (BENKERROU et al., 2002; WARE, 2010).

De modo geral, a HU reduz a frequência de crises vaso-oclusivas, a necessidade transfusional e as hospitalizações dos pacientes, além de diminuir a taxa de mortalidade em aproximadamente 40%, quando utilizada por pelo menos um ano (LANZKRON et al., 2008; STEINBERG et al., 2010; STROUSE et al., 2008). Contudo, o uso da hidroxiuréia é associado a alguns efeitos colaterais (como, por exemplo, como citopenia, hiperpigmentação, azoospermia (~ 80% dos homens), hipomagnesemia, infecções oportunistas etc.) (BORG et al., 2012; DAS; SINHA; CHAKRAVORTY, 2019). Apesar disso, o uso da HU é aceitável quando comparado com o risco de pacientes com AF não tratados (BRAWLEY et al., 2008).

Entretanto, o único tratamento potencialmente curativo atualmente disponível para a AF é o transplante de medula óssea. Entre as crianças com histórico de eventos cerebrovasculares sintomáticos que foram submetidos a transplante, não foi relatada recorrência de AVE (SWITZER et al., 2006).

2.2 MODULADORES GENÉTICOS

Apesar de ser um evento central para a fisiopatologia da AF, a polimerização da Hb S por si só não é capaz de esclarecer a variabilidade fenotípica observada dentre os pacientes com AF, que pode ser explicada em partes pela influência de fatores culturais, socioeconômicos e ambientais (CHUI; DOVER, 2001; HABARA; STEINBERG, 2016). Contudo, está cada vez mais claro que a nível fenotípico a doença apresenta um caráter multigênico, em que fatores genéticos com impacto em eventos intrínsecos e/ou extrínsecos ao eritrócito são importantes para a modulação dos fenótipos da doença (DRISS et al., 2009).

Dentre os moduladores genéticos conhecidos, alguns têm seu efeito e influência sobre as complicações da AF bem estabelecidos. Um deles é a co-herança com a alfa talassemia (α -talassemia), usualmente causada pela variante deletional de 3,7 kb nos genes da α globina (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012). Indivíduos heterozigotos ($\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$), e homozigotos ($-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$) para a variante

apresentam de forma geral uma menor taxa hemolítica, diminuição da contagem de reticulócitos, níveis mais baixos de lactato desidrogenase e bilirrubina e redução do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) (FERTRIN; COSTA, 2010). Uma vez que deleções dos genes da globina α causam um desbalanço de síntese entre cadeias globínicas α e β , há redução da Hb S e diminuição da polimerização, amenizando assim os eventos hemolíticos, o que pode levar a um efeito protetor contra complicações clínicas da doença (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; RUMANNEY et al., 2014; STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

Outro modulador conhecidos são os haplótipos da globina β^S . O gene da Hb S está em desequilíbrio de ligação com cinco haplótipos distintos, que são sítios polimórficos localizados no *cluster* da beta globina. Estes haplótipos foram nomeados de acordo com sua origem étnica e geográfica, são eles: Benin (BEN), Bantu ou República Central Africana (BAN ou CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-Indiano ou Saudi-Árabe (ARB ou SAU) (LINDENAU et al., 2016; SERJEANT et al., 2017). Dessa forma, sugeriu-se que a mutação que originou a Hb S tenha ocorrido independentemente em cinco regiões distintas e se espalhou devido a pressões seletivas (BITOUNGUI et al., 2015; PAGNIER et al., 1984).

Os haplótipos da globina β^S estão correlacionados com a modulação dos níveis de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), possivelmente mediada por variantes polimórficas na região promotora do gene da γ globina (QUINN; MILLER, 2004). A Hb F não participa da formação do polímero da Hb S e por esse motivo tem um efeito diluidor na concentração dessa hemoglobina, diminuindo o processo de polimerização. Como resultado, maiores níveis de Hb F têm um efeito benéfico para pacientes com AF (WILLIAMS; THEIN, 2018). Indivíduos com AF e haplótipo SEN ou Árabe-Indiano ARB apresentam maiores níveis de Hb F, tendendo a apresentar uma forma clínica menos grave da doença; por outro lado pacientes que apresentam haplótipo Bantu/República Central Africana CAR tendem a desenvolver um quadro clínico mais grave, pois cursam com níveis diminuídos de Hb F. Por fim, pacientes que possuem o haplótipo Benin BEN apresentam quadros clínicos intermediários (SERJEANT et al., 2017; STUART; NAGEL, 2014).

Apesar de influenciarem no fenótipo, esses moduladores isoladamente não são suficientes para elucidar as diferentes expressões fenotípicas observadas na

AF. Atualmente, o conhecimento aprimorado do genoma humano e o desenvolvimento de novas ferramentas de investigação genômica, como estudos de associação ampla do genoma (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Study*) e técnicas de sequenciamento de nova geração, oferecem novas oportunidades para usar a genética a fim de melhor compreender as causas de muitas complicações observadas em pacientes com AF (FLANAGAN et al., 2013; LETTRE, 2012). Estudos de associação do tipo genótipo-fenótipo têm ajudado a desvendar o papel de modificadores genéticos relacionados com vias importantes para a fisiopatologia da AF. Genes envolvidos na regulação das vias de inflamação, metabolismo do óxido nítrico, vasorregulação, adesão celular e hemostasia podem modular o curso clínico de indivíduos com AF e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) em alguns desses genes têm sido associados a subfenótipos da doença (SERJEANT et al., 2017; STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

2.2.1 Vitamina D

Na década de 1920 nos Estados Unidos, McCollum e colaboradores identificaram um fator presente no óleo de fígado de bacalhau capaz de curar o raquitismo (MCCOLLUM ET AL. 1922). Os pesquisadores, àquela época, denominaram o fator antirraquítico de vitamina D, a quarta vitamina a ser nomeada (HOLICK, 1994; KOSHY, 1982; PILZ et al., 2016). Posteriormente, dada suas características fisiológicas e mecanismo de ação, a vitamina D e seu metabólito ativo, a 1- α ,25-dihidroxitamina D, foram reconhecidos como pró-hormônio e hormônio respectivamente (KODICEK, 1974; NORMAN, 2012). Hoje se sabe que a vitamina D, um dos mais antigos hormônios, têm sido produzida por organismos expostos à luz solar quase desde o início da vida na Terra, revelando sua importância para o desenvolvimento de plantas e animais (HERNIGOU; AUREGAN; DUBORY, 2018; HOLICK, 2003).

A vitamina D apresenta-se sob a conformação de duas isoformas ligeiramente distintas quimicamente, a vitamina D₂ e a vitamina D₃. A vitamina D₂ (ergocalciferol) não é sintetizada pelo organismo, sendo obtida por fontes vegetais, enquanto a vitamina D₃ (colecalfiferol) é obtida de fontes animais (peixes, ovos) e cerca de 80 a 90% dessa molécula é produzida endogenamente num processo que se inicia na epiderme (CASTRO, 2011; PILZ et al., 2016). O 7-deidrocolesterol (7-DHC) é um

precursor da vitamina D₃, armazenado nas camadas profundas da epiderme, que após exposição aos raios ultravioleta B é convertido em pré-vitamina D₃, molécula termoinstável que logo é convertida a vitamina D₃ (Figura 4) (CASTRO, 2011; DELUCA, 2014).

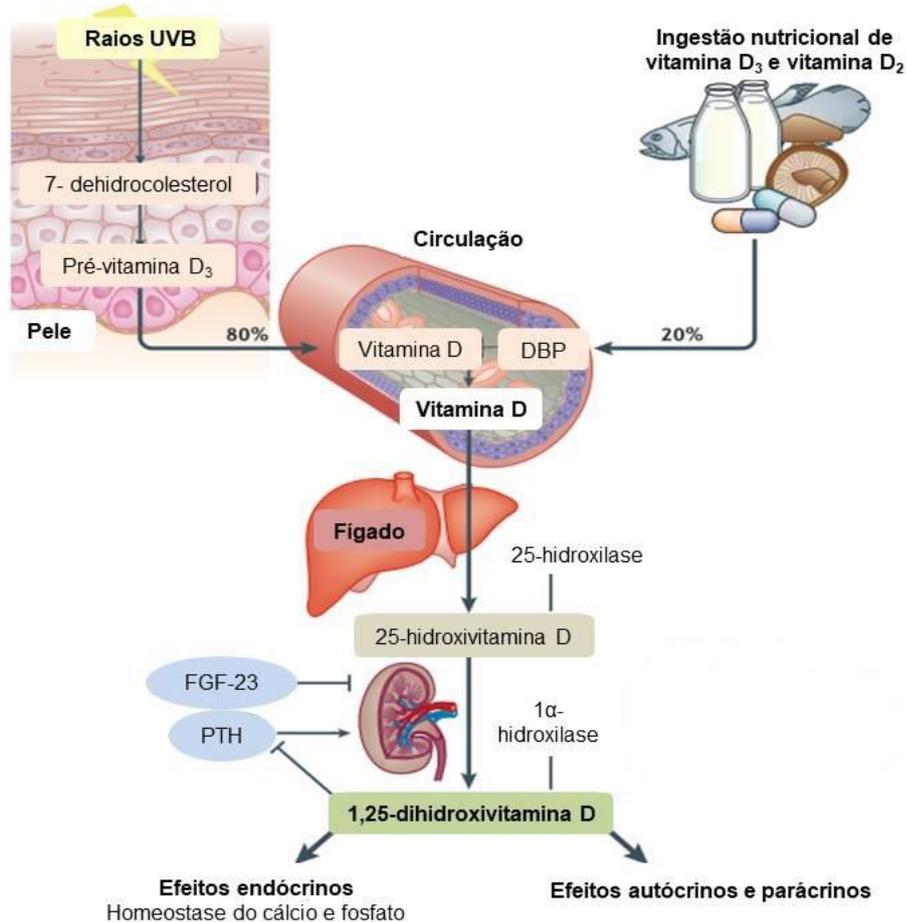


Figura 4: Via de síntese da Vitamina D. Adaptado de Pliz et al. (2016).

Como pode ser observado na figura 4, a vitamina D₃ sintetizada ou obtida na dieta e a vitamina D₂ (moléculas lipossolúveis) são transportadas no sangue ligadas a uma glicoproteína, a proteína ligadora da vitamina D (DBP, do inglês *vitamin D binding protein*). Ao chegar ao fígado, a molécula de vitamina D é hidroxilada no carbono 25 por uma hidroxilase da superfamília do citocromo P450, a CYP2R1, resultando na formação de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) (BIKLE, 2014). Já nos rins, a 25(OH)D sofre outra hidroxilação no carbono 1, mediada por uma 1-α-hidroxilase (CYP27B1), formando a 1,25-diidroxivitamina D (1,25 (OH)₂D) que é a forma ativa desse hormônio (CASTRO 2011; CHRISTAKOS et al., 2011; DELUCA, 2014). De forma geral este processo é regulado via inibição ou estímulo da 1-α-hidroxilase renal, com o paratormônio (PTH) regulando positivamente e o fator de

crescimento fibroblástico-23 (FGF-23) e a própria 1,25 (OH)₂D regulando negativamente (CHRISTAKOS ET AL. 2011; BIKLE 2014).

Para determinar laboratorialmente o status da vitamina D, a dosagem direta da vitamina D₃ ou da 1,25 (OH)₂D não é confiável visto que, a primeira tem tempo de meia vida de ≈ 24h e sofre influência da exposição solar recente ou dieta, e a segunda tem tempo de meia vida de ≈ 4h e sofre influência das necessidades fisiológicas de cálcio. Por outro lado a 25(OH)D tem tempo de meia vida de ≈ 3 semanas e sua produção é dependente da presença do substrato (SAHOTA, 2014; ZERWEKH, 2008). Assim, a deficiência de vitamina D é caracterizada pela diminuição dos níveis séricos do metabólito 25(OH)D. A despeito de ser alvo de muitas controvérsias, os valores de referência pra os níveis de 25(OH)D mais aceitos e recomendados na literatura são: > 20ng/mL níveis suficientes para população saudável, 12-20ng/mL insuficiência e < 12ng/mL deficiência (CHANG; LEE, 2019; HOLICK, 2017; VAN SCHOOR; LIPS, 2017). Para indivíduos em grupos de risco como idosos, gestantes, pacientes com osteomalácia, raquitismo, osteoporose, doenças inflamatórias, doenças autoimunes e outros, os valores suficientes recomendados são de 30 e 60 ng/mL, segundo a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML).

As ações da 1,25 (OH)₂D são mediadas, via regulação da transcrição de genes alvo, através ligação com seu receptor nuclear específico, o receptor da vitamina D (VDR, do inglês *vitamin D receptor*). Classicamente, os efeitos da vitamina D incluem a regulação do sistema ósseo e têm um impacto na fisiopatologia de doenças correlatas, como a osteoporose, osteomalácia e o raquitismo (LANHAM-NEW, 2008; THACHER; FISCHER; PETTIFOR, 2014). A 1,25 (OH)₂D age regulando a absorção intestinal e reabsorção renal de cálcio e fósforo, que formam os cristais de hidroxiapatita afim de mineralizar e fortalecer os ossos (KHAZAI; JUDD; TANGPRICHA, 2008). A 1,25 (OH)₂D exerce ainda funções parácrinas e autócrinas visto que é observada expressão extra-renal da enzima 1-α-hidroxilase, implicando em síntese de 1,25 (OH)₂D em tecidos não relacionados ao metabolismo ósseo (HOLICK, 2003). Adicionalmente, o VDR é encontrado em praticamente todos os tecidos do organismo, mostrando que a vitamina D pode estar envolvida em uma gama de mecanismos fisiológicos sistêmicos, assim como na fisiopatologia de outras doenças (ADAMS; HEWISON, 2008; HAUSSLER et al., 1997, 2013).

O catabolismo da 25(OH)D e da 1,25 (OH)₂D é mediado via hidroxilação pela 24-hidroxilase, um processo enzimático que é induzido, por exemplo, pela elevação dos níveis de 1,25 (OH)₂D e ativação do VDR, prevenindo assim a intoxicação por hipercalcemia como parte de uma alça autorregulatória (CHRISTAKOS et al., 2011; DELUCA, 2014).

2.2.2 Receptor da Vitamina D (VDR)

O VDR é um fator de transcrição nuclear dependente de ligante de 50 kDa, pertencente à superfamília de receptores nucleares tipo II, que inclui receptores como o do ácido retinóico e do hormônio da tireóide (MIZWICKI; NORMAN, 2009). Descoberto em 1968 (HAUSSLER; NORMAN, 1968), o VDR já foi identificado e clonado em diversos organismos, incluindo humanos, ratos e galinhas (DELUCA, 2004; JONES; STRUGNELL; DELUCA, 1998). Como pode ser observado no detalhe da figura 5, o VDR, assim como outros receptores de sua classe, possui estruturalmente um domínio N- terminal de ligação ao DNA, um domínio C- terminal de ligação ao ligante e uma região que mantém os dois domínios juntos. O domínio de ligação ao ligante possui regiões responsáveis pela dimerização com receptores retinóides X (RXR, *Retinoic X receptor*), pela ligação de alta afinidade com a 1,25 (OH)₂D e um domínio de ativação da transcrição chamado de AF-2, o qual é reconhecido por moléculas co-ativadoras e outros fatores de transcrição (CARLBERG; SEUTER, 2009; HAUSSLER et al., 1997; KRISTJANSSON et al., 1993).

Na ausência da 1,25 (OH)₂D, o VDR encontra-se livre no citoplasma da célula. Entretanto, ao chegar à célula alvo, a 1,25 (OH)₂D dissocia-se da DBP e liga-se a porção hidrofóbica do VDR mudando sua conformação o que facilita sua heterodimerização com um dos subtipos do cofator RXR (dependendo do tipo celular pode ser encontrado o RXR α , RXR β ou RXR γ) (LANDRY; RUPPE; GRUBBS, 2011; VON ESSEN; GEISLER, 2018). Assim, o complexo 1,25 (OH)₂D-VDR-RXR é capaz de reconhecer e ligar-se, ao chegar no núcleo, às regiões específicas da região promotora dos genes alvo chamadas de VDREs (*Vitamin D response element*). Após ligação ao VDRE o complexo induz o recrutamento de moléculas correpletórias que auxiliam na interação do VDR com a maquinaria de transcrição da RNA polimerase, desencadeando assim a resposta biológica ((Figura 5).

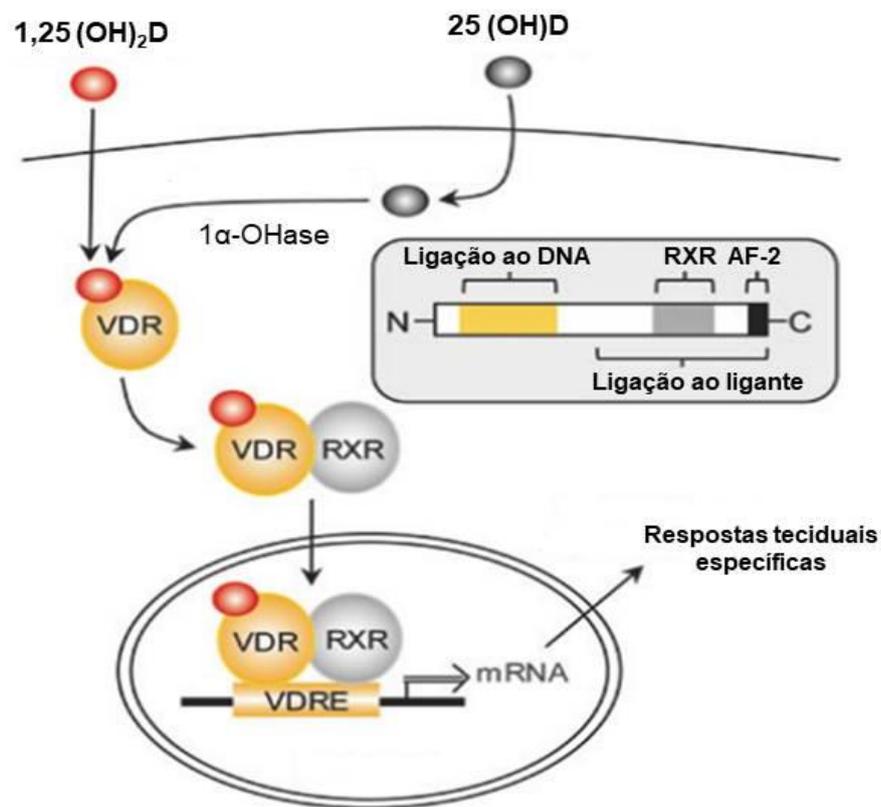


Figura 5: Mecanismo de ação do complexo VDR/Vitamina D. Após chegar à célula alvo, a 1,25-diidroxi-vitamina D se dissocia da proteína de ligação à vitamina D, é internalizada e interage com o receptor de vitamina D (VDR). O VDR forma heterodímeros com os receptores retinóides (RXR). A ligação da 1,25-diidroxi-vitamina D com o complexo VDR/RXR é seguida da ligação deste complexo com os elementos de resposta à vitamina D, os quais iniciam a transcrição na região promotora dos seus genes alvo. Uma ilustração esquemática do gene VDR é mostrada no detalhe. Adaptado de von Essen and Geisler (2018).

Dependendo do gene alvo, moléculas coativadoras ou correpressoras são recrutadas para o complexo a fim de induzir ou reprimir a transcrição gênica (GOLTZMAN; HENDY; WHITE, 2014; HAUSSLER et al., 2011, 2013). O VDR também regula negativamente a expressão de certos genes por meio do antagonismo a outros fatores de transcrição como o fator nuclear de células T ativadas (NF-AT) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (PINETTE et al., 2003).

Assim como outros receptores da sua classe, o VDR exerce ainda respostas rápidas não genômicas. Estas respostas são mediadas pela ligação da 1,25(OH)₂D com o VDR localizado nas caveolas, que são invaginações da membrana plasmática ricas em colesterol e fosfolípídeos (HAUSSLER et al., 2011). O VDR fica associado à proteína de ancoragem da caveola, a caveolina-1 e pode ativar uma variedade de vias de transdução de sinal, quinases, fosfatases e canais iônicos. As respostas

induzidas pelas ações rápidas do VDR incluem processos de migração das células musculares lisas do endotélio, rápida absorção de cálcio e exocitose de insulina (CASTRO, 2011; DEEB; TRUMP; JOHNSON, 2007).

O VDR é expresso em quase 40 tecidos diferentes, incluindo órgãos envolvidos com a homeostase do cálcio como o intestino, ossos, glândula paratireoide e rim e em outros sistemas que desempenham funções extra-calcêmicas, como o sistema imune inato e adaptativo, células pancreáticas, músculo, sistema cardiovascular, cérebro, dentre outros (CASTRO, 2011; MIZWICKI; NORMAN, 2009; NORMAN, 2012). O VDR regula a expressão de aproximadamente 900 genes relacionados com uma série de funções distintas: proliferação e diferenciação celular, apoptose, inflamação, infecção, imunidade, malignidade, estresse oxidativo, transporte de membrana, homeostase da matriz óssea e adesão celular (Quadro 1). (DEEB; TRUMP; JOHNSON, 2007; MONTICIELO et al., 2012a; QUERFELD, 2013; VON ESSEN; GEISLER, 2018).

Positivamente regulado		Negativamente regulado	
Gene	Via	Gene	Via
Osteocalcina	Remodelamento ósseo	IL-2,IL-6,IL-8,IL-12	Inflamação
Osteopontina	Remodelamento ósseo	TNF- α	Inflamação
Calbindina-9k	Ação calcêmica	IFN- γ	Inflamação
24-hidroxilase	Metabolismo	GM-CSF	Inflamação
β 3 integrina	Adesão	EGF-R	Proliferação
Receptor da IL10	Inflamação	c-myc	Proliferação
E-caderina	Adesão	Ki-67	Proliferação

Quadro 1: Exemplos de genes responsivos ao complexo vitamina D/VDR com expressão regulada positivamente ou negativamente e suas respectivas vias. IL, Interleucina; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa, IFN- γ , Interferon-gama; GM-CSF, Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos; EGF-R, Receptor do fator de crescimento epidérmico.

2.2.3 Polimorfismos genéticos no VDR

O gene que codifica o VDR abrange, estruturalmente, uma região de 75 kilobases e localiza-se no braço longo do cromossomo 12, na posição 12q13.11. O gene *VDR* possui 8 éxons codificadores de proteína (éxons 2 – 9), uma região promotora com 6 éxons não traduzidos (1a – 1f) que passam por processo de

splicing alternativo, podendo gerar múltiplos transcritos teciduais específicos e uma região 3' regulatória não traduzida. Como pode ser observado na figura 6 os éxons 2, 3 e 4 codificam aminoácidos envolvidos com o domínio de ligação ao DNA, e os éxons 6, 7, 8 e 9 estão relacionados com o domínio de ligação à vitamina D (ELHOSEINY et al., 2016; RUKIN; STRANGE, 2007; ZMUDA; CAULEY; FERRELL, 2000).

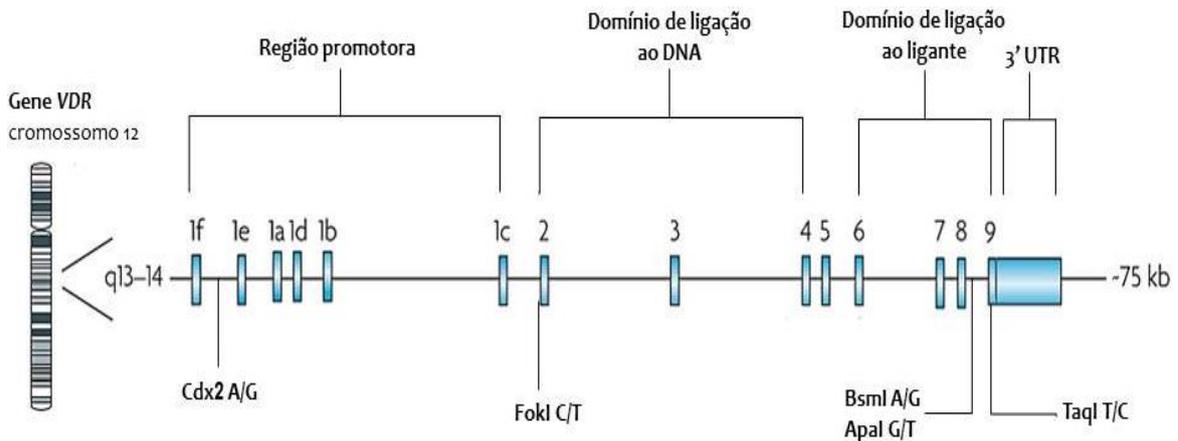


Figura 6: Organização estrutural do gene VDR e principais polimorfismos encontrados. (Adaptado de Deeb et al. 2007).

Após a clonagem e determinação da organização estrutural do *VDR* em humanos ter sido determinada por Miyamoto et al. (1997), mais de 470 polimorfismos foram descritos ao longo da região 5' promotora, dos éxons e da região 3' regulatória não traduzida (3' UTR) do gene (os principais SNPs encontrados estão ilustrados na figura 6). Estas variantes podem afetar os níveis e a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) do *VDR*, assim como alterar os mecanismos funcionais do receptor (LANDRY; RUPPE; GRUBBS, 2011; RUKIN; STRANGE, 2007; VON ESSEN; GEISLER, 2018).

Na década 1990, utilizando a técnica de RFLP (do inglês, *Restriction fragment length polymorphism*), os polimorfismos sinônimos *BsmI* (rs1544410), *ApaI* (rs7975232) e *TaqI* (rs731236) foram descobertos na região 3' terminal do gene e nomeados de acordo com as endonucleases de restrição utilizadas para sua identificação (FARACO et al., 1989; MORRISON et al., 1992, 1994). Estes SNPs localizados no íntron 8 e éxon 9 respectivamente, estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, há coocorrência dos seus alelos devido à proximidade gênica e baixa taxa de recombinação ao longo da evolução (UITTERLINDEN et al., 2004b). Contudo, visto que nenhuma dessas variantes altera a estrutura proteica do *VDR*, seu impacto

funcional é incerto. Alguns autores especulam que sua relevância funcional esteja relacionada com a alteração da expressão gênica por meio da regulação da estabilidade do mRNA (KHAN et al., 2014).

2.2.3.1 Polimorfismo *FokI*

Um caso interessante dentre os polimorfismos do VDR é o *FokI* (rs2228570), que resulta da transição de uma citosina por timina na junção do íntron 1 com o éxon 2 (ARAI et al., 1997; GROSS et al., 1996). Na presença da variante T (designada com *f*), o VDR é produzido com o tamanho completo, entretanto, na presença da variante C (designada como *F*) o primeiro códon de iniciação é abolido (ATG → ACG), permitindo que a transcrição se inicie no próximo códon de iniciação 9 pares de bases a jusante. Assim, duas formas da proteína, diferindo em 3 aminoácidos no tamanho, podem ser traduzidas a depender do sítio de início da transcrição: uma proteína maior com 427 aminoácidos (presença do alelo T ou "*f*"), também referida como forma M1, ou seja, metionina na primeira posição, ou uma proteína menor com 424 aminoácidos (presença do alelo C ou "*F*"), também referida como forma M4 referente a metionina na quarta posição (RUKIN; STRANGE, 2007; UITTERLINDEN et al., 2004a, 2004b; WHITFIELD et al., 2001).

Alguns estudos funcionais foram realizados a fim de elucidar o impacto funcional desta alteração. Arai et al. (1997) ao avaliarem a atividade de ativação transcricional das duas variantes proteicas do VDR em células HeLa, demonstraram que a proteína menor é mais eficiente como ativador transcricional do que a proteína maior (com alelo T ou *f*) (ARAI et al., 1997). Adicionalmente, Jurutka et al. (2000) mostraram que a proteína com 424 aminoácidos interage com maior eficiência ao fator de transcrição 2B (TFIIB) e apresenta atividade transcricional mais potente quando comparado à proteína de 427 aminoácidos (JURUTKA et al., 2000). Além disso, Colin et al. (2000) mostraram que células mononucleares do sangue periférico em cultura que carregavam o alelo *F*, eram mais responsivas a 1,25 (OH)₂D (COLIN et al., 2000).

Alguns autores tem demonstrado associação direta entre os níveis de 25(OH)D com os genótipos do SNP *FokI*, onde indivíduos com genótipo *ff* (TT- proteína mais longa) apresentam menores níveis deste metabólito (ELHOSEINY et al., 2016; HAO; CHEN, 2019; SMOLDERS et al., 2009; TUNCEL; TEMEL;

ERGOREN, 2019). Em seu trabalho, Supriya et al. (2018) mostram que a disfunção do VDR, resultado da presença do genótipo TT, leva à diminuição da 25(OH)D e da 1,25(OH)₂D através de um ciclo de *feedback* metabólico, visto que tanto o VDR quanto a 1,25(OH)₂D controlam a expressão das enzimas hidroxilases que participam da síntese e catabolismo da vitamina D (SUPRIYA et al., 2018).

Descrito como o polimorfismo do códon de iniciação, o *FokI* é a única variante identificada até o momento, que altera a estrutura proteica do VDR (MAHJOURI et al., 2016). Além disso, este polimorfismo é considerado um marcador molecular independente, haja vista que não aparenta estar em desequilíbrio de ligação com nenhum outro polimorfismo do *VDR* (NEJENTSEV et al., 2004).

2.2.3.2 Polimorfismo Cdx-2

Outro polimorfismo bem caracterizado no *VDR* e identificado por meio de sequenciamento direto é o Cdx-2 (rs11568820) Yamamoto et al. (1999) identificaram um sítio de ligação para um fator de transcrição específico do intestino na região promotora 1e do gene *VDR* (Figura 6). Este se trata do fator de transcrição homeobox 2 tipo caudal (CDX-2) que se liga a sequência 5'-ATAAAACTTAT-3' da região promotora do *VDR* e interage especificamente com elementos acentuadores, ativando sua expressão gênica (YAMAMOTO et al., 1999). Posteriormente, Arai et al. (2001) demonstraram a existência de uma substituição de A para G na região 5' terminal da sequência de ligação do CDX-2, em uma coorte de mulheres japonesas. Os autores demonstraram que na presença da sequência com o alelo A (5'-ATAAAACTTAT-3'), o CDX-2 ligava-se com maior afinidade quando comparado a sequência com alelo G (5'-GTAAAACTTAT-3'). Além disso, na presença do alelo A, a região promotora do *VDR* apresenta maior atividade transcricional, aumentando a expressão do *VDR* no intestino (ARAI et al., 2001).

O CDX-2 é expresso quase exclusivamente no tecido intestinal, incluindo o cólon, o duodeno e o intestino delgado, sem expressão observada nos glóbulos brancos ou outros tecidos. Em controvérsia, associações do polimorfismo Cdx-2 com condições relacionadas à função imune e inflamação como tuberculose (SELVARAJ et al., 2008), gota (LIU et al., 2014), púrpura trombocitopênica imune (YESIL et al., 2017), imunidade celular induzida por vacina contra rubéola (OVSYANNIKOVA et

al., 2010) e nascimento prematuro espontâneo (JAVORSKI et al., 2018), já foram relatadas. Assim, estes achados sugerem que o impacto deste polimorfismo em complicações extra-calcêmicas tenha um efeito tecido-específico e esteja atrelado a fatores extrínsecos à interação com o fator de transcrição CDX-2, podendo, por exemplo, estar relacionado ao efeito de SNPs funcionais em desequilíbrio de ligação com o Cdx-2. Nesse contexto, o Cdx-2 está em desequilíbrio de ligação com pelo menos 4 SNPs de funcionalidade desconhecida e com o SNP GATA (rs4516035) localizado a 5' da região promotora 1a (FANG et al., 2005). Na presença do alelo A deste SNP é criado um potencial sítio de ligação para o GATA-3, um fator de transcrição que leva à ativação de células T *naive* para células Th2 (DE JONGH et al., 2011; SELVARAJ et al., 2008).

Estudos ainda apontam relação entre o padrão de metilação da região promotora do *VDR* com os genótipos do Cdx-2. Vladioiu et al. (2017) demonstraram que homens inférteis com genótipo AA para este SNP apresentavam valores percentuais de metilação do *VDR* mais altos quando comparado aos outros genótipos (VLADOIU et al., 2017). Em concordância, Meyer and Bornman (2018) ao utilizarem monócitos/macrófagos ativados isolados de doadores saudáveis demonstraram que as células com genótipo AA em comparação com os genótipos AG e GG exibiam níveis reduzidos de 25(OH)D, maiores níveis de metilação da região promotora do *VDR* e níveis reduzidos do mRNA do *VDR* (MEYER and BORNMAN, 2018). Estes resultados apontam a metilação do *VDR* como uma possível explicação para associações observadas entre a variante Cdx-2 com condições relacionadas à imunidade, a despeito da falta de expressão de CDX-2 nas células imunes.

2.3 VITAMINA D E A ANEMIA FALCIFORME

Por meio da interação com o *VDR*, a 1,25 (OH)₂D efetua ações com impacto na fisiopatologia da AF, como, por exemplo, regulação da expressão de genes relacionados com a adesão celular, inflamação, estresse oxidativo, angiogênese, ciclo celular, dentre outros. Foi demonstrado que o complexo 1,25 (OH)₂D/*VDR* modula a inflamação por meio da repressão da produção de citocinas pró inflamatórias e indução da síntese de citocinas anti-inflamatórias (GOLTZMAN;

HENDY; WHITE, 2014; KONGSBK et al., 2013; TREHAN et al., 2017). A exemplo disto, a ativação do VDR leva à inibição da atividade transcricional do NF- κ B (fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória), levando a diminuição da liberação da interleucina 6 (IL-6), citocina pró-inflamatória (CHEN et al., 2013; JABLONSKI et al., 2011; SZETO et al., 2007).

A ativação do VDR leva à maior liberação de óxido nítrico e auxilia na regulação do tônus vascular, contribuindo para vasodilatação. Além disso, a ativação do VDR tem impacto na regulação da trombogênese, por meio da repressão do mRNA do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (*PAI-1*), fator tecidual (*F3*) e trombospondina 1 (*THBS1*) e indução da trombomodulina (*THBD*), genes pró-trombóticos e antitrombótico respectivamente (NORMAN; POWELL, 2014; PILZ et al., 2016).

Em indivíduos com a AF, a deficiência de vitamina D (VDD) é um achado frequente. Evidências apontam que crianças afro-americanas com AF possuem menores níveis de 25(OH)D quando comparadas a crianças saudáveis (Hb AA) (BUISSON et al., 2004; ROVNER et al., 2008; WYKES et al., 2014). Devido às condições socioeconômicas limitadas, pacientes com AF geralmente apresentam menor ingestão nutricional de fontes de vitamina D, baixa exposição à luz solar, influenciada também pela maior prevalência de indivíduos de pele escura e alta prevalência de disfunção renal, o que os coloca em risco para desenvolvimento de VDD. Além disso, como consequência da intensa hemólise, há maior demanda nutricional a fim de manter a alta atividade eritropoiética compensatória nesses indivíduos (NOLAN et al., 2015). Na AF, a VDD é relacionada com desfechos musculoesqueléticos como crises de dor, fragilidade óssea, osteonecrose, osteoporose e baixa densidade mineral óssea (DMO) (ADEWOYE et al., 2008; ARLET et al., 2013; KAZA; MOULTON, 2014; OSUNKWO et al., 2011).

Adicionalmente, devido às ações extra-calcêmicas da vitamina D, sua deficiência na AF poderia também estar relacionada com a inflamação crônica exacerbada, episódios de vaso-oclusão e as complicações clínicas observadas no curso da doença. De fato, estudos realizados em pacientes com AF e VDD demonstraram aumento do risco para STA, função pulmonar reduzida, maiores taxas de CVO ao ano, infecções recorrentes e associação com marcadores de

hemólise (\downarrow Hb, \uparrow LDH, \uparrow reticulócitos) (ADEGOKE et al., 2017a, 2018a; HAMDY et al., 2018; JACKSON et al., 2012; MCCASKILL et al., 2018; OZTAS et al., 2018).

Em seu estudo, Adegoke et al. (2017b) observaram um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias em crianças estáveis com AF e VDD. Após 3 meses de suplementação com vitamina D₃, os autores observaram que houve uma diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-2,6, 8, 17 e 18) e aumento da citocina anti-inflamatória IL-11 (ADEGOKE et al.,2017b). Estes achados ilustram a importância da vitamina D para a fisiopatologia da AF, visto que as citocinas aumentam a ativação do endotélio vascular, e a interação e adesão de hemácias, leucócitos e plaquetas, favorecendo a vaso-oclusão.

Apesar de a relação da vitamina D com a fisiopatologia da AF esteja, através desses estudos, se tornando clara, a nível genômico esta relação ainda é pouco explorada. A base biológica para as ações da 1,25 (OH)₂D baseia-se na expressão do VDR, e alterações na funcionalidade ou nos níveis do receptor poderiam então modificar seus mecanismos de ação. Desse modo, desde a publicação dos primeiros trabalhos relacionando os polimorfismos no gene *VDR* com complicações ósseas como osteoporose e DMO, diversos estudos foram realizados com o intuito de verificar a relação desses SNPs com outras doenças cujas fisiopatologias estão relacionadas às ações não esqueléticas da vitamina D. Assim, polimorfismos do *VDR* já foram associados com síndrome metabólica e diabetes *mellitus* (MACKAWY; BADAWI, 2014; MAHJOURI et al., 2016), diversos tipos de câncer (TEKGÜNDÜZ et al., 2017; ZHOU et al., 2013), lúpus eritematoso sistêmico (IMAM et al., 2017), artrite reumatoide (CAVALCANTI et al., 2016), tuberculose (WANG; LI, 2019), desordens neurodegenerativas (GENG et al., 2019), acidente vascular encefálico (PRABHAKAR et al., 2015), disfunção renal em pacientes com β -talassemia (DIMITRIADOU et al., 2011), hipertensão (SWAPNA et al., 2011), asma (HAN et al., 2016), dentre outros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo com comparação interna de grupos. O projeto foi desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN-UFPE). A Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) – Recife foi incluída no projeto como instituição coparticipante, onde foram coletadas as amostras de sangue periférico dos pacientes participantes e realizadas as análises dos prontuários de acompanhamento médico dos mesmos.

3.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

A amostra selecionada para o estudo é composta por indivíduos com anemia falciforme entre 02 e 25 anos de idade (até a data da censura do estudo 01/01/2020), não aparentados, de ambos os sexos, acompanhados pelo ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE - Pernambuco. Foram observados os prontuários de 567 pacientes com AF, sendo excluídos do estudo aqueles que apresentaram acompanhamento ambulatorial irregular e/ou perda de seguimento. Os dados clínicos (ocorrência das complicações clínicas) e laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação das hemoglobinas) foram obtidos pela análise dos prontuários médicos dos pacientes. De acordo com as informações colhidas sobre os respectivos cursos clínicos como definido por BALLAS et al., 2010, foi realizada a divisão dos indivíduos em grupos como se segue:

- I. Grupo sequestro esplênico: composto por indivíduos que apresentaram esplenomegalia, acompanhada pela queda nos níveis basais de hemoglobina;
- II. Grupo dactilite: composto por indivíduos que apresentaram relatos de edema em mãos e pés acompanhados de dor e/ou calor local;
- III. Grupo síndrome torácica aguda: Composto por indivíduos que apresentaram registro clínico de síndrome torácica aguda, acompanhada de exame de imagem (Raio-X) de tórax, mostrando a presença de infiltrado pulmonar;
- IV. Grupo priapismo: composto por indivíduos do sexo masculino que apresentaram registro único ou recorrente de priapismo relatado em

prontuário;

- V. Grupo doença cerebrovascular (DCV): composto por indivíduos que apresentam registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica consequente de acidente vascular encefálico (AVE) e por indivíduos com elevada faixa de risco para ocorrência de AVE determinada pela alta velocidade detectada pelo DTC (≥ 200 cm/s);
- VI. Grupo Doppler Transcraniano: composto por indivíduos que apresentaram registro de realização de Doppler Transcraniano (DTC). De acordo com a velocidade máxima obtida no DTC, os pacientes foram estratificados como se segue: DTC normal (velocidade de fluxo < 170 cm / s), DTC condicional (velocidade de fluxo entre 170-199 cm / s), e DTC alto risco (velocidade de fluxo ≥ 200 cm / s). Para as análises neste grupo, pacientes com DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica), e inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados), foram excluídos (ADAMS et al., 1998).

Adicionalmente todos os pacientes foram analisados de acordo com o número de crises vaso-oclusivas (CVOs) que necessitaram de atendimento hospitalar reportadas ao ano: < 3 CVOs/ano, $3 - 5$ CVOs/ano e > 6 CVOs/ano).

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CEP/CCS/UFPE), assim como pelo comitê de ética do HEMOPE (CAAE: 94520618.3.3001.5195) (ANEXO A). Os participantes e os responsáveis daqueles menores de 18 anos foram orientados sobre a proposta da pesquisa e quando em concordância, assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para menores de 7 a 17 anos (TALE) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para pais ou responsáveis pelos menores de 18 anos, previamente aprovado pelo CEP (ANEXO B).

3.4 DOSAGEM DA 25(OH)D SÉRICA

Foi realizada a dosagem da 25(OH)D nos indivíduos uma vez que este é o

melhor indicador do status da vitamina D no organismo (SAHOTA, 2014; ZERWEKH, 2008). Foram incluídos pacientes em terapia com hidroxiuréia, enquanto que pacientes com crise de dor e que receberam transfusões crônicas nos últimos 03 meses foram excluídos. Foram coletados cerca de 4,0 mL de sangue periférico em tubos sem anticoagulante para realização dos experimentos. Para a dosagem sérica da 25(OH)D foi empregado o método da quimiluminescência automatizada por micropartículas (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay, CMIA) com Architect 25-OH Vitamin D assay, pelo analisador Architect Plus (Abbott®, Santa Clara, California, USA). Foram considerados suficientes valores de 25(OH)D \geq 30 ng/mL, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e deficiência $<$ 20 ng/mL. Esses valores de referência foram utilizados com base em estudos anteriores com níveis de vitamina D em pacientes com AF (ADEGOKE et al., 2017a, 2018a; JACKSON et al., 2012; WINTERS et al., 2014; WYKES et al., 2014)

3.5. ANÁLISE MOLECULAR

3.5.1 Extração de DNA genômico

Cerca de 4,0 mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) foram coletados para realização dos experimentos. As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do LABCEN-UFPE, onde foram processadas para que as análises moleculares pudessem ser realizadas. A extração do DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, estabelecida por Davis et. al., (1986). O DNA obtido foi então solubilizado em água deionizada e estéril e quantificado utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

3.5.2 Genotipagem dos polimorfismos do gene VDR

Foram selecionados para este estudo dois SNPs localizados no gene *VDR* que apresentavam impacto funcional estabelecido na literatura: rs2228570 (*FokI*) e rs11568820 (*Cdx-2*). Além disso, outro critério de seleção foi que os SNPs

apresentassem MAF (do inglês, *minor allele frequency*) igual ou superior a 10% na população africana (YRI) e caucasiana (CEU).

A metodologia empregada para a realização das genotipagens foi PCR em tempo real por discriminação alélica utilizando o sistema de sondas TaqMan®. As sondas utilizadas no estudo foram VIC (*yellow*) e FAM (*green*) e os *primers* utilizados para pesquisa dos polimorfismos estão disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site (<https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C__12060045_20 e C__2880808_10). Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália), disponibilizado para uso no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE/UFPE).

As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, utilizando 5 µL de Taqman Genotyping Master Mix (Thermofisher, Foster City, EUA), 0,25 µL de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA), 3,75 µL de H₂O ultrapura e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL. A ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi plotado os sinais de fluorescência para cada amostra e assim discriminando os alelos presentes, conforme recomendações do fabricante (Life Technologies, Califórnia, USA).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado usando o teste de Chi-quadrado. Para comparações entre variáveis categóricas, o teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher (quando aplicável) foi utilizado, enquanto que os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento. Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de log-rank utilizado para a comparação das curvas. Todos os valores de P foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) e GraphPad Prism (version 6.0) (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA COORTE

Dos prontuários de 567 pacientes com AF analisados, 29 foram excluídos do estudo por apresentarem acompanhamento ambulatorial irregular e/ou perda de seguimento, de modo que 538 indivíduos foram incluídos na análise. Desses pacientes, 263 (49%) eram do sexo feminino e 275 (51%) do sexo masculino. A mediana de idade destes indivíduos foi de 14 anos (variação: 2 – 25 anos). Os dados da caracterização laboratorial da população geral constam na tabela 2. Dos 538 pacientes, 305 (56%) desenvolveram pelo menos uma das complicações estudadas (SEA, dactilite, STA, doença cerebrovascular e priapismo), sendo a dactilite a de maior prevalência (29%), seguido pelo SEA (20%) e DCV (13%) (Tabela 3).

Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo.

Variável laboratorial	Mediana	Intervalo
Hb F (%)	8,10	0,9 – 28,5
Contagem de hemácias ($\times 10^{12}$ células/ μ L)	2,58	1,64 – 4,98
Hemoglobina (g/dL)	7,80	4,2 – 11,6
Hematócrito (%)	22,85	14,7 – 35,1
Volume corpuscular médio (fL)	88,10	53,4 – 116,3
Hemoglobina corpuscular média (g/dL)	29,40	17,3 – 38,6
Contagem de leucócitos ($\times 10^6$ /L)	13,9	2,1 – 48,9
Contagem de plaquetas ($\times 10^9$ /L)	434	114 – 981
Contagem de reticulócitos (%)	10,05	1,5 – 32
Lactato desidrogenase (U/L)	827,5	124 – 2756
Bilirrubina total (mg/dL)	2,24	0,21 – 39,0
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,79	0,14 – 11,0

Tabela 3: Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo.

Características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo	n (%)
Sexo	
Feminino	263 (49%)
Masculino	275 (51%)
Idade	
Intervalo (anos)	02 – 25
Mediana (anos)	14
Sequestro esplênico	110 (20%)
Intervalo de idade (anos)	0,0 – 10
Mediana de idade (anos)	02
Dactilite	154 (29%)
Intervalo de idade (anos)	0,0 – 10
Mediana de idade (anos)	01
Síndrome torácica aguda	55 (10%)
Intervalo de idade (anos)	03 – 21
Mediana de idade (anos)	08
Priapismo	39 (14%*)
Intervalo de idade (anos)	02 – 20
Mediana de idade (anos)	09
Doença cerebrovascular	71 (13%)
Intervalo de idade (anos)	1 – 19
Mediana de idade (anos)	05
Doppler Transcraniano	445 (82%)
Normal	311 (70%)
Condicionante	93 (21%)
Alto risco	41 (09%)
Crises vaso-oclusivas por ano, no último ano	
< 3	315 (58%)
3 – 5	148 (27%)
> 6	62 (11%)
Número de complicações dentre as 5 avaliadas neste grupo	
0	233 (43%)
1	202 (37%)
2 ou mais	103 (20%)
*Porcentagem incluindo apenas indivíduos do sexo masculino	

Dos pacientes classificados no grupo DCV, 41 (58%) desenvolveram AVE. Desses 41, 11 tinham DTC normal (11/311, 3,5%), 06 tinham DTC condicionante (06/93, 6,4%) e 11 tinham DTC de alto risco (11/41, 27%). Os outros 13 pacientes possuíam DTC inadequado ou inconclusivo. Os pacientes excluídos das análises com DTC incluíam: 65 pacientes que nunca realizaram o exame, 28 pacientes com DTC inadequado ou DTC inconclusivo. Outras complicações menos frequentes (e por este motivo não utilizadas nas análises de associação) não mostradas na tabela 3 incluem: úlcera maleolar (17 pacientes, 03%) osteonecrose (16 pacientes, 03%), nefropatia (09 pacientes, 1,6%), cardiopatia (19 pacientes, 04%) e hipertensão arterial sistêmica (10 pacientes, 02%).

4.2 GENOTIPAGEM DOS SNPS DO GENE *VDR*

A genotipagem dos SNPs do gene *VDR*, *FokI* e *Cdx-2* foi realizada nos 538 indivíduos. A distribuição genotípica dos SNPs apresentou-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). As frequências alélicas e genotípicas dos referidos polimorfismos podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4: Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estudados na população.

Gene <i>VDR</i> SNP	Genótipos	Frequência genotípica (n e %)	Alelos	Frequência alélica (%)
<i>FokI</i> rs2228570	CC	247 (46%)	C	0,68
	CT	243 (45%)		
	TT	48 (09%)	T	0,32
<i>Cdx-2</i> rs11568820	AA	110 (20%)	A	0,46
	AG	279 (52%)		
	GG	149 (28%)	G	0,54

4.3 ASSOCIAÇÃO DOS SNPS DO GENE VDR COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA AF

Para as análises de associação foram aplicados os modelos de herança genética recessivo, dominante e codominante. Como pode ser observado na Tabela suplementar 1 (ANEXO C), independente do modelo genético empregado, não observamos associação entre o polimorfismo Cdx-2 com as complicações clínicas dos pacientes com AF. Com relação aos dados laboratoriais foi observado que indivíduos com genótipo homocigoto variante GG apresentavam maiores níveis de Hb F ($p=0,014$). Para o polimorfismo *FokI* ao aplicar o modelo de associação recessivo, que assume análise do genótipo homocigoto recessivo (TT) versus os genótipos heterocigoto (CT) e homocigoto selvagem (CC), observamos que indivíduos com genótipo homocigoto variante TT apresentavam maior frequência de DCV ($p=0,009$; OR: 2,7; IC 95%: 1,33 – 5,82) (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo *FokI*, de acordo com modelo de herança recessivo.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N = 538	Homocigoto variante TT Total: 48 N(%)	Heterocigoto CT+ Homocigoto Selvagem CC Total: 490 N (%)	OR (IC 95%)	p-valor
Hb F (%) mediana	8,10	7,00	8,1		0,490
Intervalo	0,9 – 28,5	1,5 – 24,5	0,9 – 28,5		
RBC ($\times 10^{12}$ / μ L), mediana	2,58	2,57	2,58		0,899
Intervalo	1,64 – 4,98	1,89 – 3,48	1,64 – 4,98		
Hb (g/dL), mediana	7,8	7,7	7,8		0,891
Intervalo	4,2 – 11,6	6,2 – 11,6	4,2 – 11,1		
Ht (%), mediana	22,8	22,9	22,8		0,858
Intervalo	14,7 – 35,1	19,8 – 33,2	14,7 – 35,1		
VCM (fL), mediana	88,1	87,2	88,1		0,290
Intervalo	53,4 – 116,3	76,4 – 108,5	53,4 – 116,3		
WBC ($\times 10^6$ /L), mediana	13,9	13,2	14,0		0,868
Intervalo	2,1 – 48,9	6,1 – 25,6	2,1 – 48,9		
PLT ($\times 10^9$ /L), mediana	434	450	433		0,953
Intervalo	114 – 981	195 – 748	114 – 981		
Reticulócitos (%), mediana	10,0	10,7	10,0		0,956
Intervalo	1,5 – 32,0	2,6 – 26,7	1,5 – 32,0		
BT (mg/dL), mediana	2,24	2,9	2,2		0,015*
Intervalo	0,21 – 39,0	0,65 – 9,07	0,21 – 39,0		
BI (mg/dL), mediana	1,79	2,35	1,77		0,055

	0,14 – 11,0	0,35 – 8,60	0,14 – 11,0		
Intervalo					
Sexo					
Feminino	263	29 (60%)	234 (48%)	1 (ref). 0,59	0,099
Masculino	275	19 (40%)	256 (52%)	(0,32 – 1,09)	
SEA					
Sim	110	09 (19%)	101 (21%)	1 (ref). 0,88	0,853
Não	425	39 (81%)	386 (79%)	(0,41 – 1,88)	
Dactilite					
Sim	154	11 (23%)	143 (29%)	1 (ref). 0,71	0,406
Não	381	37 (77%)	344 (71%)	(0,35 – 1,44)	
STA					
Sim	55	02 (4%)	53 (11%)	1 (ref). 0,36	0,209
Não	478	45 (96%)	433 (89%)	(0,08 – 1,54)	
Priapismo					
Sim	39	03 (15%)	36 (14%)	1 (ref). 1,08	1,000
Não	238	17 (85%)	221 (86%)	(0,30 – 3,88)	
DCV					
Sim	71	12 (32%)	59 (14%)	1 (ref). 2,7	0,009*
Não	382	26 (68%)	356 (86%)	(1,33 – 5,82)	
DTC					
Normal	311	18 (51%)	293 (71%)		0,007*
Condicionante	93	09 (26%)	84 (20%)		
Alto risco	41	08 (23%)	33 (9%)		
CVO por ano, no último ano					
< 3	315	29 (60%)	286 (59%)		0,391
3 – 5	148	16 (33%)	132 (27%)		
> 6	62	03 (7%)	59 (14%)		
N de complicações					
0	233	24 (50%)	209 (43%)		0,157
1	202	12 (25%)	190 (39%)		
2 ou mais	103	12 (25%)	91 (18%)		

HbF: Hemoglobina fetal, RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, SEA: Sequestro esplênico agudo, STA: Síndrome torácica aguda, DCV: Doença cerebrovascular, DTC: Doppler transcraniano, CVO: Crises vasooclusivas.

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Ao analisar a frequência do alelo polimórfico T do *FokI* observamos que este encontra-se associado com o risco de desenvolvimento de DCV ($p=0,03$; OR: 1,5; IC 95%: 1,02 – 2,16). Com relação às análises com o DTC foi observada diferença estatística entre o polimorfismo *FokI* com o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo cerebral nos pacientes com AF alocados nos grupos DTC normal, condicionante e alto risco, onde portadores do genótipo TT apresentavam maior frequência de resultados de DTC na faixa condicionante e alto risco para AVE ($p=0,007$). Ao agruparmos os pacientes com resultados de DTC alterado (faixa condicionante e alto risco) e analisarmos frente aos pacientes com DTC normal, observamos que os indivíduos com genótipo homocigoto variante (TT)

apresentavam uma frequência de DTC alterado de 49%, enquanto que indivíduos de genótipo homozigoto selvagem e heterozigoto (CC + CT) tinham uma frequência de 28% ($p=0,020$; OR: 2,36; IC 95%: 1,17 – 4,74). No que concerne às análises laboratoriais, como pode ser visto na tabela 5, foi verificado que indivíduos com genótipo homozigoto variante TT, apresentavam maiores níveis de BT ($p=0,015$), e apesar não significativo, maiores níveis de BI ($p=0,055$).

O impacto do polimorfismo *FokI* no modelo recessivo (homozigoto variante, TT, versus homozigoto selvagem, CC e heterozigoto, CT) foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento da DCV. Dos pacientes que desenvolveram DCV, 70 pacientes (98%) apresentaram o relato de diagnóstico da complicação na data aproximada, sendo estes utilizados para o modelo de risco cumulativo. A idade mediana para o desenvolvimento de DCV foi de 05 anos (intervalo: 1 a 19 anos). A média de seguimento para desenvolvimento de DCV foi de 21 anos (IC95%: 21 a 22 anos). Os pacientes homozigotos selvagens (CC) e heterozigotos (CT) apresentaram um seguimento médio de 22 anos (IC95%: 21 a 22) e homozigotos variantes (TT) apresentaram seguimento médio de 18 anos (IC95%: 15 a 21), com taxa de desenvolvimento de DCV de 16% e 33% para cada grupo respectivamente ($p=0,003$) (Figura 7).

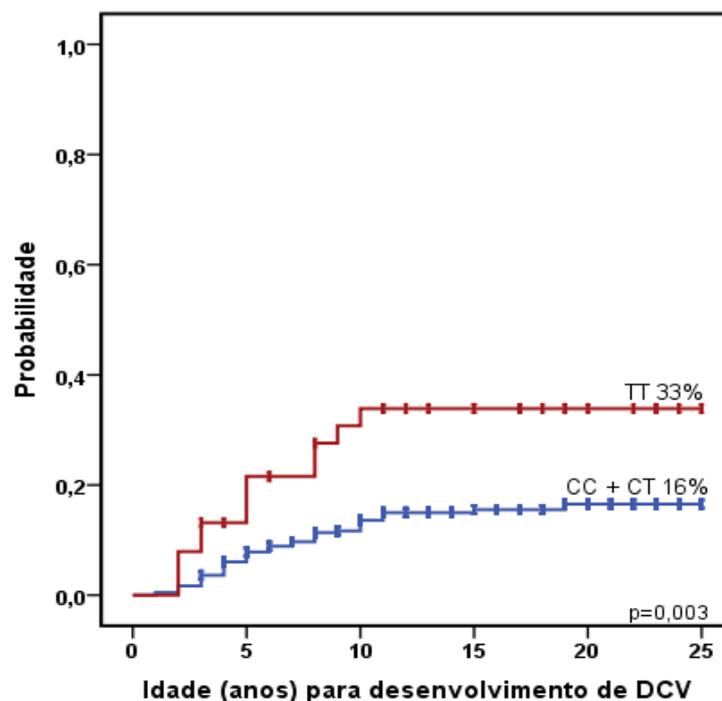


Figura 7: Probabilidade cumulativa para desenvolvimento de DCV em pacientes com AF de acordo com os genótipos para o polimorfismo *FokI*.

Para as demais complicações estudadas não foi observada associação significativa com relação à análise de incidência cumulativa: SEA $p=0,878$, dactilite $p=0,347$, STA $p=0,113$ e priapismo $p=0,952$.

4.4 ASSOCIAÇÃO DA 25-HIDROXIVITAMINA D COM AS VARIÁVEIS CLINICO-LABORATORIAIS DOS PACIENTES E OS SNPS DO GENE VDR

A dosagem da 25(OH)D sérica foi realizada em 45 pacientes dos 538 estudados. A média dos níveis de 25(OH)D foi de 21,8 ng/mL e a mediana foi de 20,9 ng/mL (variação, 10 – 37,2 ng/mL). Destes pacientes, 18 (40%) tinham deficiência de vitamina D (25(OH)D < 20ng/mL), 22 (49%) tinham níveis insuficientes (25(OH)D 20 – 30 ng/mL) e 05 (11%) possuíam níveis suficientes (25(OH)D > 30 ng/mL). A Tabela 6 mostra a comparação dos parâmetros clínicos nos pacientes com vitamina D deficiente (25(OH)D < 20ng/mL) e naqueles com níveis de vitamina D sérica acima de 20ng/mL. Os dois grupos apresentaram características semelhantes.

Tabela 6: Comparação dos achados clínicos dos pacientes com AF com os níveis de 25(OH)D.

Variáveis clínicas	Todos os pacientes n=45 n (%)	25(OH)D < 20ng/mL n=18 n (%)	25(OH)D > 20 ng/mL n =27 n (%)	P
Idade	11 (02 – 22)	12 (04 – 21)	10 (02 – 22)	0,363
Sexo				0,125
Feminino	20 (44)	11 (61)	09 (33)	
Masculino	25 (56)	07 (39)	18 (67)	
SEA				0,449
Sim	09 (20)	05 (28)	04 (15)	
Não	36 (80)	13 (72)	23 (85)	
Dactilite				0,482
Sim	11 (24)	03 (17)	08 (30)	
Não	34 (76)	15 (83)	19 (70)	
DTC				0,272
Normal	22 (58)	08 (44)	14 (70)	
Condicionante	06 (16)	04 (22)	02 (10)	
Alto risco	10 (26)	06 (34)	04 (20)	
DCV				0,503
Sim	14 (37)	08 (44)	06 (30)	
Não	24 (63)	10 (56)	14 (70)	
Priapismo				0,474
Sim	02 (08)	01 (14)	01 (06)	
Não	23 (92)	06 (86)	17(94)	

SEA: Sequestro esplênico agudo, DTC: Doppler transcraniano, DCV: Doença cerebrovascular.

Com relação aos polimorfismos do gene *VDR*, inicialmente foi analisado os níveis séricos de 25(OH)D frente aos três genótipos que poderiam ser apresentados para os polimorfismos *FokI* e *Cdx-2*. Como pode ser observado na figura 8A e 8B não foi observada diferença nos níveis de 25(OH)D ($P > 0,05$).

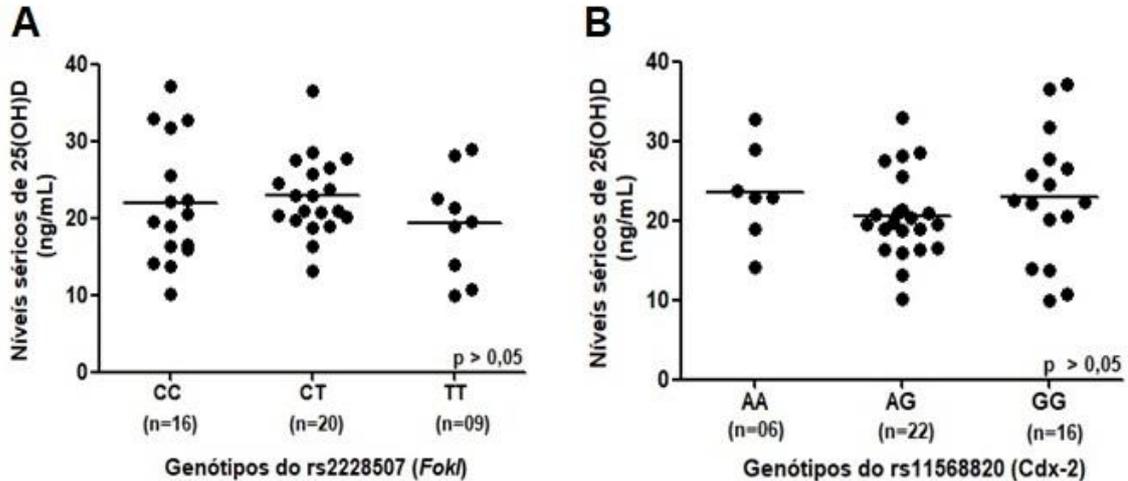


Figura 8: Avaliação dos níveis de 25(OH)D sérica de acordo com os polimorfismos *FokI* e *Cdx-2* do gene *VDR*. A) Níveis de 25(OH)D sérica em pacientes com AF de acordo com os três genótipos possíveis para o polimorfismo *FokI* (rs2228507); B) Níveis de 25(OH)D sérica em pacientes com AF de acordo com os três genótipos possíveis para o polimorfismo *Cdx-2* (rs11568820).

Contudo, observou-se que pacientes que foram tratados com hidroxiuréia (HU), apresentaram menores níveis de 25(OH)D do que os pacientes que não foram tratados com HU ($p = 0,005$; Figura 9). Ao analisar apenas os pacientes que fizeram uso de HU foi observado que indivíduos de genótipo TT para o polimorfismo *FokI* apresentavam menores níveis de 25(OH)D quando comparado aos outros genótipos (TT: 13,9 ng/mL, 10 – 19,5 ng/mL; CC/CT: 20,2 ng/mL, 10,2 – 37,2 ng/mL; $p = 0,03$). Este achado não foi observado no grupo de indivíduos sem uso de HU ($p > 0,05$).

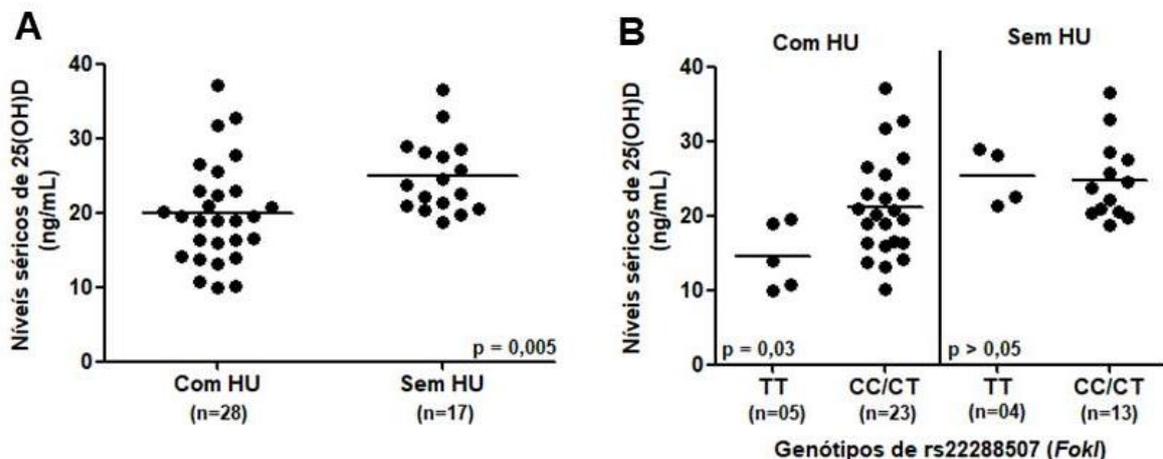


Figura 9: Análise dos níveis de 25(OH)D com o tratamento ou não com hidroxiuréia (HU). A) Pacientes tratados com HU apresentam menores níveis de 25(OH)D. B) Análise dos níveis de 25(OH)D sérica em pacientes com AF com e sem uso de HU de acordo com o polimorfismo *FokI* (rs2228507).

Ao analisar os níveis de 25(OH)D sérica nos pacientes que desenvolveram DCV, frente aos genótipos apresentados pelo polimorfismo *FokI*, observamos que nos pacientes com DCV, há uma diminuição dos níveis de 25(OH)D nos indivíduos com genótipo homozigoto variante (TT) quando comparado aos indivíduos com genótipos CC e CT (TT: 12,3 ng/mL, 10 – 18,9 ng/mL; CC/CT: 20,9 ng/mL, 13,1 – 32,8 ng/mL $p = 0,03$; Figura 10). Contudo, ao avaliar os pacientes que não desenvolveram esta complicação não há diferença significativa entre os genótipos ($p > 0,05$; Figura 10).

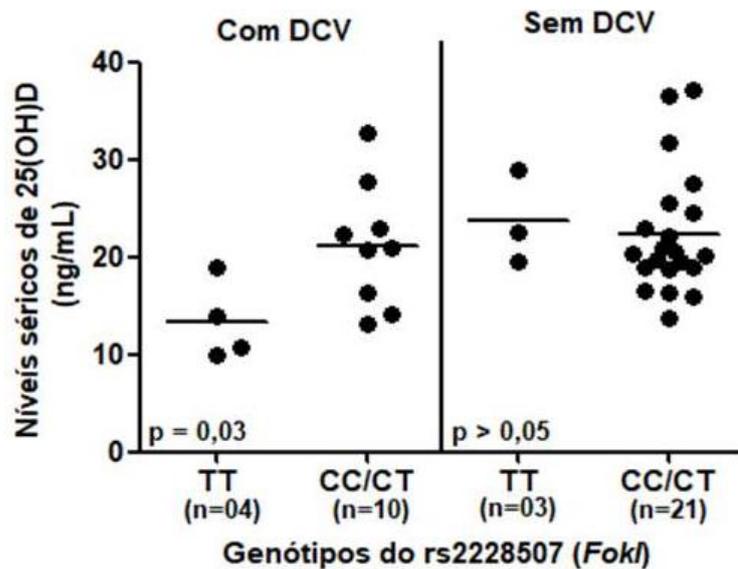


Figura 10: Análise dos níveis de 25(OH)D sérica em pacientes com AF de acordo com o polimorfismo *FokI* (rs2228507). O lado esquerdo mostra pacientes que apresentaram doença cerebrovascular (DCV), enquanto o lado direito mostra pacientes que não apresentaram esta complicação.

5 DISCUSSÃO

A atividade biológica da vitamina D é mediada via interação com o VDR, e este complexo efetua inúmeras ações pleiotrópicas. Dessa forma, alterações no gene *VDR* poderiam levar a uma disfunção do receptor, o que pode afetar o metabolismo do cálcio, a proliferação celular, a resposta imune e inflamação (CHAROENNGAM; SHIRVANI; HOLICK, 2019; MACKAWY; BADAWI, 2014; ZHOU et al., 2013). Neste trabalho foi observada a associação do polimorfismo *FokI* do gene *VDR* com risco de desenvolvimento de doença cerebrovascular e com DTC alterado em pacientes com AF. Estes resultados sustentam o papel da deficiência de vitamina D na fisiopatologia de vasculopatias e complicações cerebrais. Na AF, complicações que envolvem a perturbação do sistema nervoso central, como o AVE, são relacionadas ao aumento da morbidade e mortalidade (FAROOQ; TESTAI, 2019). Na sua gênese, uma série de eventos fisiopatológicos estão relacionados, como: aumento da adesão eritrocitária, ativação endotelial, aumento de espécies reativas de oxigênio, mediadores inflamatórios, adesivos e trombóticos, além da diminuição da produção de mediadores citoprotetores, como o NO (FASANO; MEIER; HULBERT, 2015; GUILLIAMS; FIELDS; DOWLING, 2019).

A vitamina D é um hormônio neuroprotetor que regula várias rotas genômicas e não genômicas (BIKLE, 2014; QUERFELD, 2013). Estudos apontam que a deficiência de vitamina D está relacionada com o risco de doença vascular e complicações cerebrovasculares como AVE isquêmico (PARK et al., 2015; QIU et al., 2017; WAJDA et al., 2019). Ao avaliar a relação da deficiência de vitamina D com a gravidade do AVE em modelo animal, Sayeed et al. (2019) observaram que ratos submetidos a uma dieta deficiente de vitamina D apresentavam lesão na barreira hematoencefálica pós-AVE mais grave quando comparados aos animais com os níveis adequados desta vitamina. Outro estudo realizado por Won et al. (2015), mostrou um efeito protetor direto, mediado pelo *VDR*, da vitamina D contra a disfunção da barreira hematoencefálica induzida por lesão isquêmica em células endoteliais cerebrais.

Demonstramos que indivíduos com AF e genótipo homozigoto variante TT para o polimorfismo *FokI* do gene *VDR* apresentavam uma frequência maior de doença cerebrovascular ($p=0,009$; OR: 2,7; IC 95%: 1,33 – 5,82). As análises de risco cumulativo mostraram que os pacientes com genótipo TT apresentaram uma

maior taxa de desenvolvimento de DCV (33%) quando comparado aos genótipos CT e CC (16%) e que estes indivíduos aparentavam manifestar esta complicação em um menor intervalo de tempo ($p=0,003$). Adicionalmente, este polimorfismo mostrou-se relacionado com as velocidades do DTC, onde indivíduos de genótipo homozigoto variante tinham maior frequência de DTC na faixa condicionante e alto risco para AVE ($p=0,007$) quando comparado aos outros genótipos. Estes resultados mostram uma associação, até o momento não descrita, deste SNP com complicações cerebrovasculares da AF, corroborando com as consequências funcionais deste polimorfismo anteriormente relatadas. Em concordância com nossos resultados, Prabhakar et al. (2015) observaram que a presença do genótipo ff (TT) do *FokI* conferiu um risco aumentado para AVE isquêmico em uma coorte de 313 indivíduos sem anemia falciforme da Índia ($p=0,02$). Essa associação mostrou-se independente de várias covariáveis como idade, gênero, tabagismo, ingestão de álcool, glicose sérica, perfil lipídico, insulina, e níveis de 25-hidroxivitamina D.

Alguns possíveis mecanismos podem explicar a associação entre o polimorfismo *FokI* do *VDR* e risco para doença cerebrovascular na AF. A vitamina D e o *VDR* tem impacto em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Assim, a redução da atividade das vias de sinalização dependentes do *VDR* causadas pelos SNPs, poderia influenciar a taxa de transcrição desses genes, contribuindo para a inflamação e vasculopatia presentes na ocorrência desta complicação. A exemplo disto, Mackawy and Badawi (2014), ao estudarem indivíduos com diabetes tipo 2, observaram que indivíduos com genótipo TT para o *FokI* apresentaram maiores níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 e menores níveis de vitamina D, e Angel et al. (2016) demonstraram que os genótipos CT e TT desta variante apresentavam uma diminuição da resposta ou resistência à ação anti-inflamatória da vitamina D, também em indivíduos com diabetes tipo 2 (MACKAWY and BADAWI, 2014; ANGEL et al., 2016).

Além disto, evidências sugerem o papel do *VDR* no controle do tônusvascular, por meio da regulação da expressão da enzima que sintetiza o NO, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Sabe-se que a diminuição da biodisponibilidade do NO (potente vasodilatador) e consequente disfunção endotelial são características comuns à patogênese de complicações cerebrovasculares (AKINSHEYE; KLINGS, 2010; ZHU et al., 2016). Neste contexto, Andrukhova et al. (2013) mostraram que

camundongos carregando uma forma funcionalmente inativa do VDR, eram caracterizados por menor biodisponibilidade de NO e menores níveis de expressão da eNOS, levando a disfunção endotelial. Recentemente (ENKHJARGAL et al., 2019), demonstraram que o pré-tratamento com vitamina D previne o remodelamento e espasmo da artéria cerebral após hemorragia subaracnóide em ratos e que, molecularmente, este mecanismo foi associado ao aumento da fosforilação da eNOS (mecanismo essencial para liberação de NO) na artéria cerebral, através de sinalização dependente do VDR. Finalmente, a perturbação dos mecanismos hemostáticos também é um possível mecanismo que leva a complicações cerebrais. Camundongos silenciados para o gene *VDR*, exibem maior taxa de agregação plaquetária, diminuição da expressão dos genes da trombosmodulina e antitrombina e formação exacerbada de trombos em vários órgãos (AIHARA et al., 2004).

Na presença da variante T do SNP *FokI*, há formação de uma proteína VDR mais longa, o que pode levar a uma diminuição na sua atividade transcricional favorecendo as complicações cerebrovasculares. No entanto, resultados conflitantes já foram reportados na literatura. Em alguns estudos o alelo de risco para doenças como artrite reumatoide e hipertensão foi o alelo C (F, proteína menor) (MAALEJ et al., 2005; SWAPNA et al., 2011). Outros estudos não demonstraram relação do SNP *FokI* com complicações extra-calcêmicas como diabetes, lúpus e complicações crônicas da diabetes (AVE, retinopatia, nefropatia e neuropatia) (ALMEIDA et al., 2015; MAHJOURI et al., 2016; MONTICIELO et al., 2012b). O primeiro trabalho a avaliar as variantes do *VDR* com complicações da AF foi realizado por Hamed et al. (2010), ao relacionar as variantes *FokI* e *BsmI* com parâmetros relacionados a mineralização óssea em crianças com DF no Egito. Apesar de não encontrar associação com o *FokI*, os autores observaram diferença nos níveis de osteocalcina de acordo com os genótipos do SNP *BsmI*. Clay et al. (2015) avaliaram a relação de polimorfismos no gene *VDR* e de outros genes relacionados ao metabolismo da vitamina D com a gravidade da doença em indivíduos com AF nos EUA, entretanto os SNPs frequentemente analisados nos estudos de associação (*FokI*, *BsmI*, *TaqI* e *Apal*), não se mostraram relacionados com as complicações da doença.

Estas disparidades entre estudos podem ser explicadas pelas diferenças genéticas entre as populações étnicas distintas ou a exposição a fatores ambientais

(CRUZ et al., 2019). Em seu trabalho, O'Neill et al. (2013) demonstraram que os genótipos do SNP *FokI* influenciam a capacidade de transativação do VDR de maneira dependente do gene alvo, onde possivelmente as duas isoformas do VDR interajam de forma distinta com os VDREs em diferentes genes alvos. Este autor ainda argumenta que o impacto de variantes funcionais do *VDR* pode ser exacerbado pela deficiência de vitamina D ou, alternativamente, reduzido por sua produção ou ingestão adequada, podendo, portanto, confundir a associação dos polimorfismos do *VDR* com doenças (O'NEILL et al., 2013). Paralelamente, tem sido demonstrado associação direta entre os níveis de 25(OH)D com os genótipos do SNP *FokI*, onde indivíduos com genótipo ff (TT-proteína mais longa) apresentam menores níveis deste metabólito (ELHOSEINY et al., 2016; HAO; CHEN, 2019; SMOLDERS et al., 2009; SUPRIYA et al., 2018; TUNCEL; TEMEL; ERGOREN, 2019).

Neste trabalho observamos que indivíduos que desenvolveram DCV e tinham genótipo homozigoto variante TT para o polimorfismo *FokI*, apresentavam menores níveis de 25(OH)D, sugerindo que este polimorfismo possa estar relacionado com a modulação dos níveis de 25(OH)D, contribuindo assim para as complicações cerebrovasculares na AF ($p=0,03$). Adicionalmente, os níveis de 25(OH)D mostraram-se relacionados com a terapia com HU, estando diminuídos nos pacientes que fizeram uso do medicamento ($p=0,005$). Estudos que relacionaram os níveis de 25(OH)D com o uso de HU na AF mostram resultados conflitantes. Semelhante aos nossos resultados, Lee et al. (2015) em um estudo realizado com 95 crianças com doença falciforme, observaram que no grupo de indivíduos que estavam em uso de HU, os níveis de 25(OH)D eram menores do que no grupo sem uso de HU (11.9 ng/mL \pm 7.2 versus 19.7 ng/mL \pm 11.8, $p=0.005$). Em controvérsia, Adegoke et al. (2018a) em um estudo realizado com 98 crianças com AF, mostraram resultados opostos (24.1 \pm 1.2 ng/mL para o grupo com HU e 19.1 \pm 9.8 ng/mL, para o grupo sem HU, $p=0,007$).

Apesar de já ter sido demonstrada a interação de diversas drogas com os níveis de 25(OH)D (PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2007; ROBIEN et al., 2013; VAN ORTEN-LUITEN et al., 2014), o mecanismo pelo qual o uso de HU poderia influenciar nos níveis de 25(OH)D ainda não é conhecido. A metabolização da HU acontece no fígado e sua excreção é via renal. Contudo, ainda não se sabe se a HU

pode interferir no processo de 25-hidroxilação da vitamina D em 25(OH)D no fígado. As possíveis implicações no mecanismo de conversão do 7-DHC em pré-vitamina D₃ na pele e os efeitos na absorção intestinal também não são conhecidos.

O'Neill et al. (2013) especula que o status da vitamina D possa influenciar o impacto das variantes funcionais do *VDR* na função do receptor e no risco de doença associado. Nós demonstramos que naqueles pacientes que desenvolveram DCV e estavam em uso de HU, a presença do genótipo TT do polimorfismo *FokI* determinava menores níveis de vitamina D, fato este não observado no grupo de indivíduos sem DCV ou sem uso de HU, onde não houve diferença nos níveis entre os genótipos. Dessa forma é possível especular que sob a influência de fatores que levem à diminuição da vitamina D, a presença do receptor alterado, resultado do polimorfismo *FokI*, acentue a deficiência da 25(OH)D contribuindo para um quadro clínico adverso nesses pacientes.

Em relação ao polimorfismo *Cdx-2* não observamos associação com as manifestações clínicas da AF, independente do modelo genético empregado. No que diz respeito às variáveis laboratoriais verificamos relação deste SNP com os níveis de Hb fetal, onde indivíduos de genótipo AA, apresentavam menores níveis em relação a indivíduos com genótipos AG e GG: 6,9%, 8,2%, 9,3% respectivamente ($p=0,014$). Uma vez que a Hb F não participa do processo de polimerização da Hb S, indivíduos com maiores níveis desta hemoglobina são beneficiados. Que seja do nosso conhecimento, não há na literatura, trabalhos relacionando diretamente o impacto do complexo 1,25 (OH)₂D/*VDR* na regulação da expressão das cadeias γ globínicas, as quais fazem parte do tetrâmero da Hb F ($\alpha^2\gamma^2$). Contudo, o complexo 1,25 (OH)₂D/*VDR* induz o gene *FOXO3*, que codifica um importante fator de transcrição envolvido na prevenção de danos oxidativos, regulação da maturação eritróide, regulação do ciclo celular, controle da apoptose, inflamação e dentre outros (AN et al., 2010; ROEHLEN et al., 2018). Recentemente, Zhang et al. (2018) ao utilizar a metodologia de sequenciamento completo do exoma em pacientes com AF, identificaram o *FOXO3* como um forte regulador positivo da indução da γ globina, aumentando os níveis de Hb F. Esta relação foi confirmada por meio de estudos funcionais em cultura de células progenitoras eritróides. Dessa forma esses achados podem conectar o *VDR*, o *FOXO3* e a Hb Fetal, com um

possível impacto de variantes polimórficas potencialmente funcionais do *VDR* neste mecanismo.

Nosso estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas para analisarmos os dados com cautela. Primeiramente, os níveis séricos de 25(OH)D foram medidos no pós-estado de doença (DCV), o que pode não refletir o status da vitamina D antes do início da complicação, pois este pode ter sido comprometido devido à própria doença ou o uso da HU, resultando em níveis séricos mais baixos de 25(OH)D. Ademais, a falta de dados sobre suplementos vitamínicos, quantidade e frequência de atividade física, o que poderia influenciar no status da vitamina D. Por fim, o número reduzido de pacientes utilizados para a avaliação do status da vitamina D também pode limitar a generalização de nossos achados.

A existência de trabalhos que avaliem o impacto de polimorfismos genéticos com as velocidades do DTC na AF é escassa. Estudos realizados com irmãos com AF demonstraram que, quando um deles apresenta altas velocidades de fluxo sanguíneo cerebral no DTC ou um AVE, a probabilidade de o segundo irmão apresentar o mesmo quadro é maior, demonstrando que há um componente genético envolvido (DRISCOLL, 2003; KWIATKOWSKI et al., 2003). Dessa forma, a avaliação da influência de genes na modulação da doença cerebrovascular na AF é interessante, pois a incorporação de marcadores moleculares juntamente ao DTC beneficiará os pacientes, principalmente aqueles com DTC normal ou DTC inadequado/inconclusivo, uma vez que é sabido que o risco de AVE neles existe, embora não seja identificado pelo método usual de prevenção, que é o DTC.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados é possível concluir que:

- O polimorfismo Cdx-2 (rs11568820) do gene *VDR* não mostrou associação com as principais complicações clínicas observadas em pacientes com AF em nossa população;
- O polimorfismo *FokI* (rs2228570) do gene *VDR* mostrou-se associado com desenvolvimento de doença cerebrovascular (DCV) e com a ocorrência de DTC alterado em indivíduos com AF;
- Pacientes com genótipo TT (homozigoto variante) para o polimorfismo *FokI*, apresentaram uma menor mediana de tempo para desenvolvimento de DCV, quando comparados com os genótipos CT (heterozigoto) e CC (homozigoto variante);
- Indivíduos que realizaram tratamento com hidroxiuréia têm menores níveis de 25(OH)D do que pacientes que não realizaram o tratamento;
- Indivíduos que desenvolveram DCV ou estavam em uso de hidroxiuréia e tinham genótipo homozigoto variante TT para o polimorfismo *FokI*, apresentavam menores níveis de 25(OH)D.

REFERÊNCIAS

- AASLID, R.; MARKWALDER, T.-M.; NORNES, H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. **Journal of Neurosurgery**, v. 57, n. 6, p. 769–774, dez. 1982.
- ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Unexpected actions of vitamin D: New perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 80–90, 2008.
- ADAMS, R. J. et al. Transcranial Doppler correlation with cerebral angiography in sickle cell disease. **Stroke**, v. 23, n. 8, p. 1073–1077, 1992.
- ADAMS, R. J. et al. Stroke prevention trial in sickle cell anemia. **Control Clin Trials**, v. 19, n. 1, p. 110–129, 1998.
- ADAMS, R. J. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3689–3694, maio 2004.
- ADAMS, R. J. Prevention of Stroke in Sickle Cell Anemia. **The Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 42, n. 2, p. 135–138, jun. 2014.
- ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D.; OPTIMIZING PRIMARY STROKE PREVENTION IN SICKLE CELL ANEMIA TRIAL, I. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 353, n. 26, p. 2769–2778, 2005.
- ADAMS, R. J.; OHENE-FREMPONG, K.; WANG, W. Sickle cell and the brain. **Hematology**, p. 31–46, 2001.
- ADEGOKE, S. A. et al. Influence of serum 25-hydroxyvitamin D on the rate of pain episodes in Nigerian children with sickle cell anaemia. **Paediatrics and International Child Health**, v. 37, n. 3, p. 217–221, 2017a.
- ADEGOKE, S. A. et al. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and inflammatory cytokines in paediatric sickle cell disease. **Cytokine**, v. 96, n. March, p. 87–93, 2017b.
- ADEGOKE, S. A. et al. The Association of Serum 25-Hydroxyvitamin D with Biomarkers of Hemolysis in Pediatric Patients with Sickle Cell Disease. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, n. 2, p. 159–162, 2018a.
- ADEGOKE, S. A. et al. Impact of Hydroxyurea on Anthropometry and Serum 25-Hydroxyvitamin D among Children with Sickle Cell Disease. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, n. 4, p. e243–e247, 2018b.
- ADEWOYE, A. H. et al. Sickle cell bone disease : Response to vitamin D and calcium. **American Journal of Hematology**, v. 83, p. 271–274, 2008.

- AIHARA, K. I. et al. Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35798–35802, 2004.
- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E. S. Sick cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 3, p. 620–625, 2010.
- ALMEIDA, J. M. DE et al. The association between Vitamin D receptor gene polymorphisms (TaqI and FokI) and micro/macrovacular complications in postmenopausal women with type 2 diabetes. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, p. 131–136, 2015.
- AN, B. et al. Stimulation of Sirt1-Regulated FoxO Protein Function by the Ligand-Bound Vitamin D Receptor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 20, p. 4890–4900, 2010.
- ANDRUKHOVA, O. et al. Vitamin D Is a Regulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Arterial Stiffness in Mice. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 1, p. 53–64, 2014.
- ANELE, U. A. et al. How I Treat How I treat priapism. **Blood**, v. 125, n. 23, p. 2–4, 2018.
- ANGEL, B. et al. FokI polymorphism in vitamin D receptor gene: Differential expression of TNF α in peripheral mononuclear cells of type 2 diabetic subjects. **Meta Gene**, v. 7, p. 1–6, 2016.
- ARAI, H. et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon : Effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 6, 1997.
- ARAI, H. et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 7, p. 1256–1264, 2001.
- ARDUINI, G. A. O.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Prevalence and Characteristics of Priapism in Sick Cell Disease. **Hemoglobin**, v. 42, n. 2, p. 73–77, 2018.
- ARLET, J. B. et al. Relationship between vitamin D deficiency and bone fragility in sickle cell disease: A cohort study of 56 adults. *Bone*, v. 52, n. 1, p. 206–211, 2013.
- AZAR, S.; WONG, T. E. Sick Cell Disease: A Brief Update. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 375–393, 2017.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.
- BENKERROU, M. et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients

with sickle cell anemia. **Blood**, v. 99, n. 7, p. 2297–2303, 2002.

BIKLE, D. D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 3, p. 319–29, 2014.

BISWAL, S. et al. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. **Hematology**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 2018.

BITOUNGUI, V. J. N. et al. Beta-Globin Gene Haplotypes Among Cameroonians and Review of the Global Distribution: Is There a Case for a Single Sickle Mutation Origin in Africa? **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 19, n. 3, p. 171–179, 2015.

BOPP, T. et al. Acute chest syndrome in sickle cell disease. **Revue Medicale Suisse**, v. 14, n. 623, p. 1844–1848, 2018.

BORG, J. et al. KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in beta-hemoglobinopathy patients. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 13, p. 1487–1500, 2012.

BRAWLEY, O. W. et al. NIH consensus development statement on hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **NIH Consens State Sci Statements**, v. 25, n. 1, p. 1–30, 2008.

BREWEN, J.; KAYA, B.; CHAKRAVORTY, S. How I manage sickle cell patients with high transcranial doppler results. **British Journal of Haematology**, p. 1–12, 2017.

BROUSSE, V. et al. Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: Cohort study of 190 paediatric patients. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 5, p. 643–648, 2012.

BUISSON, A. M. et al. Low vitamin d status in children with sickle cell disease. **The Journal of Pediatrics**, v. 145, p. 622–627, 2004.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.

CARLBERG, C.; SEUTER, S. A Genomic Perspective on Vitamin D Signaling. **Anticancer Research**, v. 29, p. 3485–3493, 2009.

CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 566–575, 2011.

CAVALCANTI, C. A. J. et al. Vitamin D receptor polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis brazilian patients. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 1, p. 41–51, 2016.

CHANG, S.-W.; LEE, H.-C. Vitamin D and Health - the Missing Vitamin in Humans. **Pediatrics & Neonatology**, 2019.

CHARACHE, S.; SCOTT, J.; CHARACHE, P. "Acute Chest Syndrome" in Adults With Sickle Cell Anemia. **Arch Intern Med (Chic)**, v. 139, n. 1, p. 67–69, 1979.

CHAROENNGAM, N.; SHIRVANI, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, v. 10, n. 6, p. 1082–1093, 2019.

CHEN, Y. et al. Vitamin D receptor inhibits nuclear factor kb activation by interacting with I κ B kinase β protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 27, p. 19450–19458, 2013.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism. **Endocrinology And Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 243–253, 2011.

CHUI, D. H. K.; DOVER, G. J. Sickle cell disease: No longer a single gene disorder. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 13, n. 1, p. 22–27, 2001.

CLAY, E. L. J. et al. The Polymorphisms in the Vitamin D Receptor Gene and Disease Severity in Sickle Cell Disease. **Advances in Biological Chemistry**, v. 5, p. 24–33, 2015.

COLIN, E. M. et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Clinical Endocrinology**, v. 52, n. 2, p. 211–216, 2000.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 263–299, 2018.

CRISTINA, A. et al. Socioeconomic and nutritional characteristics of children and adolescents with sickle cell anemia : a systematic review. **Rev Paul Pediatr.**, v. 36, n. 4, p. 491–499, 2018.

CRUZ, P. R. S. et al. Genetic comparison of sickle cell anaemia cohorts from Brazil and the United States reveals high levels of divergence. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

DAS, S. S.; SINHA, R.; CHAKRAVORTY, N. Integrative microRNA and gene expression analysis identifies new drug repurposing candidates for fetal hemoglobin induction in β -hemoglobinopathies. **Gene**, v. 706, n. January, p. 77–83, 2019.

DE FRANCESCHI, L. et al. Thrombosis and sickle cell disease. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 37, n. 3, p. 226–36, 2011.

DE JONGH, R. T. et al. Associations between vitamin D receptor genotypes and mortality in a cohort of older Dutch individuals. **European Journal of Endocrinology**, v. 164, n. 1, p. 75–82, 2011.

DEEB, K. K.; TRUMP, D. L.; JOHNSON, C. S. Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 684–700, 2007.

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. February, p. 1689–1696, 2004.

DELUCA, H. F. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. **BoneKEy Reports**, v. 3, n. January, p. 1–8, 2014.

DESAI, P.; ATAGA, K. The acute chest syndrome of sickle cell disease. **Expert Opin. Pharmacother.**, 2013.

DIMITRIADOU, M. et al. Fok-I Polymorphism of Vitamin D Receptor Gene and the Presence of Renal Dysfunction in Patients with β -Thalassemia Major. n. April, p. 509–516, 2011.

DRISCOLL, M. C. Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2401–2404, 2003.

DRISS, A. et al. Sickle cell disease in the post genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype. **Genomics Insights**, v. 2, n. 1, p. 23–48, 2009.

ELFORD, H. L. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 33, n. 1, p. 129–135, 1968.

ELHOSEINY, S. M. et al. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms (FokI, BsmI) and their Relation to Vitamin D Status in Pediatrics β eta Thalassemia Major. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 32, n. 2, p. 228–238, 2016.

EMOND, A. M. et al. Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: Natural history and management. **The Journal of Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 201–206, 1985.

ENKHJARGAL, B. et al. Vitamin D attenuates cerebral artery remodeling through VDR/AMPK/eNOS dimer phosphorylation pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 272–284, 2019.

ENNINFUL-EGHAN, H. et al. Transcranial Doppler ultrasonography and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. **J Pediatr**, v. 157, n. 3, p. 479–484, 2010.

FANG, Y. et al. Promoter and 3'-Untranslated-Region Haplotypes in the Vitamin D Receptor Gene Predispose to Osteoporotic Fracture : The Rotterdam Study. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 77, p. 807–823, 2005.

FARACO, J. H. et al. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 5, p. 94043, 1989.

FAROOQ, S.; TESTAI, F. D. Neurologic Complications of Sickle Cell Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 19, n. 4, 2019.

FASANO, R. M.; MEIER, E. R.; HULBERT, M. L. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 1, p. 17–25, 2015.

FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**, v. 3, n. 4, p. 443–458, 2010.

FLANAGAN, J. M. et al. Hydroxycarbamide alters erythroid gene expression in children with sickle cell anaemia. **British journal of haematology**, v. 157, p. 240–248, 2012.

FLANAGAN, J. M. et al. Genetic mapping and exome sequencing identify two mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3237–3245, 2013.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850– 58, 2007.

GBD MORTAL. CAUSES DEATH COLLAB. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9963, p. 117–171, 2015.

GENG, J. et al. A systematic review and meta-analysis of the associations of vitamin D receptor genetic variants with two types of most common neurodegenerative disorders. **Ageing Clinical and Experimental Research**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

GOLTZMAN, D.; HENDY, G. N.; WHITE, J. H. Vitamin D and its receptor during late development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 25, 2014.

GROSS, C. et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal mexican-American women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 12, p. 1850–1855, 1996.

GUILLIAMS, K. P.; FIELDS, M. E.; DOWLING, M. M. Advances in Understanding Ischemic Stroke Physiology and the Impact of Vasculopathy in Children With Sickle Cell Disease. **Stroke**, p. 1–8, 2019.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 689–696, 2016.

HAMDY, M. et al. Vitamin D and nonskeletal complications among egyptian sickle cell disease patients. **Advances in Hematology**, p. 1–7, 2018.

HAMED, H. M. et al. Vitamin D Receptor Polymorphisms and Indices of Bone

Turnover and Bone Mass in Egyptian Children with Sickle Cell Disease. **Research Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2010.

HAN, J. C. et al. Vitamin D receptor polymorphisms may contribute to asthma risk. **Journal of Asthma**, v. 53, n. 8, p. 790–800, 2016.

HAO, Y.; CHEN, Y. Vitamin D levels and vitamin D receptor variants are associated with chronic heart failure in Chinese patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, p. 1–7, 2019.

HAUSSLER, B. Y. M. R.; NORMAN, A. W. Chromosomal Receptor for a Vitamin D Metabolite. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 62, n. 1, p. 155–162, 1968.

HAUSSLER, M. R. et al. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. **The Journal of endocrinology**, v. 154 Suppl, p. S57-73, 1997.

HAUSSLER, M. R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D 3 : Genomic and non-genomic mechanisms. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 543–559, 2011.

HAUSSLER, M. R. et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 77–98, 2013.

HERNIGOU, P.; AUREGAN, J. C.; DUBORY, A. Vitamin D: part I; from plankton and calcified skeletons (500 million years ago) to rickets. **International Orthopaedics**, v. 42, n. 9, p. 2273–2285, 2018.

HERRICK, J. Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. **Arch Intern Med (Chic)**, v. 6, n. 5, p. 517–521, 1910.

HOLICK, M. F. McCollum Award Lecture, 1994: Vitamin D-new horizons for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 4, p. 619–630, 1994.

HOLICK, M. F. Vitamin D: A millenium perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 296–307, 2003.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 18, n. 2, p. 153–165, 2017.

HOPPE, C. Defining stroke risk in children with sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 128, n. 6, p. 751–766, 2005.

HUTTLE, A. et al. Sickle Cell in Sickle Cell Disease in Latin America and the United States. **Pediatr Blood Cancer**, v. 62, p. 1131–1136, 2015.

IMAM, A. A. et al. Vitamin D receptor gene FokI polymorphism in Egyptian children and adolescents with SLE : A case-control study. **Lupus**, v. 0, p. 1–9, 2017.

JABLONSKI, K. L. et al. 25-Hydroxyvitamin D Deficiency Is Associated With Inflammation-Linked Vascular Endothelial Dysfunction in Middle-Aged and Older Adults. **Hypertension**, v. 57, p. 63–69, 2011.

JACKSON, T. C. et al. Vitamin D deficiency and comorbidities in children with sickle cell anemia. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 29, n. 3, p. 261–266, 2012.

JAIN, S.; BAKSHI, N.; KRISHNAMURTI, L. Acute Chest Syndrome in Children with Sickle Cell Disease. **Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology**, v. 30, n. 4, 2017.

JAVORSKI, N. et al. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms are associated to spontaneous preterm birth and maternal aspects. **Gene**, v. 642, n. June 2017, p. 58–63, 2018.

JONES, G.; STRUGNELL, S. A.; DELUCA, H. F. Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 4, p. 1193–1231, 1998.

JUNIOR, G. B.; DAHER, E.; ROCHA, F. A. Osteoarticular involvement in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 2, p. 156–164, 2012.

JURUTKA, P. W. et al. The Polymorphic N Terminus in Human Vitamin D Receptor Isoforms Influences Transcriptional Activity by Modulating Interaction with Transcription Factor IIB. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 401–420, 2000.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 4, n. 18010, 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**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.

KAZA, P. L.; MOULTON, T. Severe vitamin D deficiency in a patient with sickle cell disease: A case study with literature review. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 36, n. 4, p. 293–296, 2014.

KHAN, M. I. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: Current state and future approaches (Review). **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 2, p. 349–363, 2014.

KHAZAI, N.; JUDD, S. E.; TANGPRICHA, V. Calcium and Vitamin D: Skeletal and Extraskelatal Health. **Curr Rheumatol Rep**, v. 10, n. 2, p. 110–117, 2008.

KODICEK, E. The story of vitamin D: From vitamin to hormone. **The Lancet**, p. 262–275, 1974.

KONGSBAK, M. et al. The vitamin D receptor and T cell function. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. 148, 2013.

KOSHY, K. T. Vitamin D: An update. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 2, p. 137–153, 1982.

KRISTJANSSON, K. et al. Two Mutations in the Hormone Binding Domain of the Vitamin. n. 29, p. 3–7, 1993.

KWIATKOWSKI, J. L. et al. Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. **British journal of haematology**, v. 121, n. 6, p. 932–937, jun. 2003.

LANDRY, C. S.; RUPPE, M. D.; GRUBBS, E. G. Vitamin D receptor and parathyroid glands. **Endocrine and practice**, v. 17, p. 63–68, 2011.

LANHAM-NEW, S. A. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 2, p. 163–176, 2008.

LANZKRON, S. et al. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Ann Intern Med**, v. 148, n. 12, p. 939–955, 2008.

LEE, M. T. et al. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia (STOP): extended follow-up and final results. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 847–853, 2006.

LEE, M. T.; LICURSI, M.; MCMAHON, D. J. Vitamin D deficiency and acute vaso-occlusive complications in children with sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**, v. 62, p. 643–647, 2015.

LETTRE, G. The Search for Genetic Modifiers of Disease Severity in the β - Hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor Perspect Med**, 2012.

LINDENAU, J. D. et al. The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB*S globin gene haplotypes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 515–523, 2016.

LIU, S. et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor and risk of gout in Chinese Han male population. **Rheumatol Int**, 2014.

LOBO, C. L. DE C. et al. Newborn Screening Program for Hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil. **Pediatr Blood Cancer**, v. 61, p. 34–39, 2014.

LONERGAN, G. J.; CLINE, D. B.; ABBONDANZO, S. L. Sickle cell anemia. Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc, v. 21, n. 4, p. 971–94, 2001.

MAALEJ, A. et al. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 8, p. 707–711, 2005.

MACKAWY, A. M. H.; BADAWI, M. E. H. Association of vitamin D and vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic inflammation, insulin resistance and metabolic syndrome components in type 2 diabetic Egyptian patients. **Meta Gene**, v. 2, p. 540–556, 2014.

MAHJOURI, I. et al. Lack of association between FokI polymorphism in vitamin D receptor gene (VDR) & type 2 diabetes mellitus in the Tunisian population. **Indian Journal of Medical Research**, v. 144, n. JULY, p. 46–51, 2016.

MCCASKILL, M. L. et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D and Diet Mediates Vaso-Occlusive Related Hospitalizations in Sickle-Cell Disease Patients. **Nutrients**, v. 10, n. 1384, p. 1–15, 2018.

MEIER, E. R.; MILLER, J. L. Sickle Cell Disease in Children. **Drugs**, v. 72, n. 7, p. 895–906, 2012.

MEYER, V.; BORNMAN, L. Cdx-2 polymorphism in the vitamin D receptor gene (VDR) marks VDR expression in monocyte/macrophages through VDR promoter methylation. **Immunogenetics**, v. 70, n. 8, p. 523–532, 2018.

MIYAMOTO, K. et al. Structural Organization of the Human Vitamin D Receptor Chromosomal Gene and Its Promoter. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 8, p. 1165–1179, 1997.

MIZWICKI, M. T.; NORMAN, A. W. The Vitamin D Sterol – Vitamin D Receptor Ensemble Model Offers Unique Insights into Both Genomic and Rapid-Response Signaling. **Science Signaling**, v. 2, n. 75, p. 1–15, 2009.

MONTICIELO, O. A. et al. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 31, n. 10, p. 1411–1421, 2012a.

MONTICIELO, O. A. et al. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 21, n. 1, p. 43–52, 2012b.

MORRIS, C. R. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. **Haematologica**, v. 96, n. 1, p. 1–5, 2011.

MORRISON, N. A. et al. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 15, p. 6665–6669, 1992.

MORRISON, N. A. et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, v. 367, n. 20, p. 284–287, 1994.

NEJENTSEV, S. et al. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D

receptor gene. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 15, p. 1633–1639, 2004.

NOLAN, V. G. et al. Prevalence of Vitamin D deficiency in sickle cell disease: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

NORMAN, A. W. The history of the discovery of vitamin D and its daughter steroid hormone. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 3, p. 199–206, 2012.

NORMAN, P. E.; POWELL, J. T. Vitamin D and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 114, n. 2, p. 379–393, 2014.

NYAKUNDI, B. B. et al. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 β production upon intravascular hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 2, p. 464–475, 2019.

O'NEILL, V. et al. Vitamin D Receptor Gene Expression and Function in a South African Population: Ethnicity, Vitamin D and FokI. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. 10, p. 532–537, 2011.

OHENE-FREMPONG, B. K. et al. Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. **Blood**, p. 288–295, 1998.

OSUNKWO, I. et al. Vitamin D deficiency and chronic pain in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 153, n. 4, p. 538–540, 2011.

OVSYANNIKOVA, I. G. et al. Rubella vaccine-induced cellular immunity : evidence of associations with polymorphisms in the Toll-like , vitamin A and D receptors , and innate immune response genes. **Hum Genet**, v. 127, p. 207–221, 2010.

OZTAS, Y. et al. Vitamin D Deficiency and Its Association with Inflammatory Markers, Lipid Profile and Regulatory T-cells in Pediatric Sickle Cell Disease Patients. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 34, n. 3, p. 480–485, 2018.

PAGNIER, J. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 6, p. 1771–3, 1984.

PARK, K. Y. et al. Serum Vitamin D Status as a Predictor of Prognosis in Patients with Acute Ischemic Stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 40, n. 1–2, p. 73–80, 2015.

PATTERSON, G. D. et al. Recurrent Acute Chest Syndrome in Pediatric Sickle Cell Disease: Clinical Features and Risk Factors. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, n. 1, p. 51–55, 2018.

PAULING, L. et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, v. 110, n. 3, p. 543–548, 1949.

- PÉREZ-CASTRILLÓN, J. L. et al. Effects of Atorvastatin on Vitamin D Levels in Patients With Acute Ischemic Heart Disease. **American Journal of Cardiology**, v. 99, n. 7, p. 903–905, 2007.
- PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 104, 2010.
- PIEL, F. B. et al. Global Burden of Sickle Cell Anaemia in Children under Five, 2010-2050: Modelling Based on Demographics, Excess Mortality, and Interventions. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 7, 2013.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.
- PILZ, S. et al. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. **Nature Reviews Cardiology**, v. 13, n. 7, p. 404–417, 2016.
- PINETTE, K. V et al. Vitamin D Receptor as a Drug Discovery Target. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 193–204, 2003.
- PITANGA, T. N. et al. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. **Cytokine**, v. 83, p. 75–84, 2016.
- PLATT, O. S. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. 2008.
- PRABHAKAR, P. et al. Genetic variants of vitamin D receptor and susceptibility to ischemic stroke. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 456, n. 2, p. 631–636, 2015.
- QIU, H. et al. Vitamin D status and the risk of recurrent stroke and mortality in ischemic stroke patients: Data from a 24-month follow-up study in China. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 21, n. 7, p. 766–771, 2017.
- QUERFELD, U. Vitamin D and inflammation. **Pediatric Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 605–610, 2013.
- QUINN, C. T.; MILLER, S. T. Risk factors and prediction of outcomes in children and adolescents who have sickle cell anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, n. 6 SPEC.ISS., p. 1339–1354, 2004.
- RANKINE-MULLINGS, A. E. et al. Transcranial Doppler velocity among Jamaican children with sickle cell anaemia: determining the significance of haematological values and nutrition. **British Journal of Haematology**, v. 181, n. 2, p. 242–251, 2018.
- REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 4, p. 433–445, 2012.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v.

376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

ROBIEN, K. et al. Drug-vitamin D interactions: A systematic review of the literature. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 28, n. 2, p. 194–208, 2013.

ROEHLEN, N. et al. Vitamin D , FOXO3a , and Sirtuin1 in Hashimoto ' s Thyroiditis and Differentiated Thyroid Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 1–9, 2018.

ROVNER, A. J. et al. High Risk of Vitamin D Deficiency in Children with Sickle Cell Disease. **J Am Diet Assoc.**, v. 108, p. 1512–1516, 2008.

RUKIN, N. J.; STRANGE, R. C. What Are the Frequency, Distribution, and Functional Effects of Vitamin D Receptor Polymorphisms as Related to Cancer Risk? **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 8, p. 96–101, 2007.

RUMANEY, M. B. et al. The co-inheritance of alpha-thalassemia and sickle cell anemia is associated with better hematological indices and lower consultations rate in Cameroonian patients and could improve their survival. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.

SAHOTA, O. Understanding vitamin D deficiency. **Age and Ageing**, v. 43, n. 5, p. 589–591, 2014.

SANTOS, J. P. DOS; GOMES NETO, M. Sociodemographic aspects and quality of life of patients with sickle cell anemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 4, p. 2–5, 2013.

SAYEED, I. et al. Vitamin D deficiency increases blood-brain barrier dysfunction after ischemic stroke in male rats. **Experimental Neurology**, v. 312, n. November 2018, p. 63–71, 2019.

SELVARAJ, P. et al. Regulatory region polymorphisms of vitamin D receptor gene in pulmonary tuberculosis patients and normal healthy subjects of south India. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, n. 3, p. 251–254, 2008.

SERJEANT, G. R. One hundred years of sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 151, n. 5, p. 425–429, 2010.

SERJEANT, G. R. et al. Variability of homozygous sickle cell disease : The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, n. March, p. 0–1, 2017.

SMOLDERS, J. et al. Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1–2, p. 117–121, 2009.

SOLÉ-RIBALTA, A. et al. Dactylitis, early onset of drepanocytosis and a predictor of a poor prognosis. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 82, n. 4, p. 267–268, 2015.

SONATI, M. DE F.; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: the hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, v. 0, n. 0, p. 40–51, 2008.

STEINBERG, M. H. et al. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 48, n. 3, p. 175–181, 1995.

STEINBERG, M. H. Management of Sickle Cell Disease. **Drug Therapy**, v. 340, n. 13, p. 1021–1030, 1999.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The Scientific World JOURNAL**, v. 8, p. 1295–1324, 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**, v. 85, n. 6, p. 403–408, 2010.

STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Current opinion in hematology**, v. 13, n. 3, p. 131–6, 2006.

STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 8, p. 795–803, 2012.

STOCKMAN, J. A. et al. Occlusion of large cerebral vessels in sickle-cell anemia. **N Engl J Med**, v. 287, n. 17, p. 846–849, 1972.

STROUSE, J. J. et al. Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v. 122, n. 6, p. 1332–1342, 2008.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. S1, 2014.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease - Elsevier Medical Artwork. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 14, p. 261–290, 2019.

SUPRIYA, M. et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and vascular dementia due to cerebral small vessel disease in an Asian Indian cohort. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 391, n. 2017, p. 84–89, 2018.

SWAPNA, N. et al. Risk conferred by FokI polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene for essential hypertension. **Indian Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 3, p. 201–206, 2011.

SWITZER, J. A. et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 6, p. 501–512, 2006.

SZETO, F. L. et al. Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF- κ B activity in fibroblasts. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 3–5, p. 563–566, 2007.

TEKGÜNDÜZ, S. A. et al. Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in pediatric patients presenting with hodgkin's lymphoma. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 39, n. 2, p. e59–e61, 2017.

THACHER, T. D.; FISCHER, P. R.; PETTIFOR, J. M. Vitamin D treatment in calcium-deficiency rickets: A randomised controlled trial. **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 99, n. 9, p. 807–811, 2014.

TREHAN, N. et al. Vitamin D Deficiency, Supplementation, and Cardiovascular Health. **Critical Pathways in Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 109–118, 2017.

TUNCEL, G.; TEMEL, S. G.; ERGOREN, M. C. Strong association between VDR FokI (rs2228570) gene variant and serum vitamin D levels in Turkish Cypriots. **Molecular Biology Reports**, v. 3, n. 0123456789, 2019.

UITTERLINDEN, A. G. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89–90, p. 187–193, 2004a.

UITTERLINDEN, G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v. 338, p. 143–156, 2004b.

VAN ORTEN-LUITEN, A. C. B. et al. The association between drugs frequently used by the elderly and vitamin D blood levels: A review of observational and experimental studies. **Drugs and Aging**, v. 31, n. 2, p. 111–123, 2014.

VAN SCHOOR, N.; LIPS, P. Global Overview of Vitamin D Status. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 46, n. 4, p. 845–870, 2017.

VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: Is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **British Journal of Haematology**, v. 139, n. 2, p. 173–184, 2007.

VERLHAC, S. Transcranial Doppler in children. **Pediatric Radiology**, v. 41, n. SUPPL. 1, 2011.

VICHINSKY, E. P. et al. Causes and Outcoms of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 25, p. 1855–1865, 2000.

VLADOIU, S. et al. The involvement of VDR promoter methylation, CDX-2 VDR polymorphism and vitamin d levels in male infertility. **Acta Endocrinologica**, v. 13, n. 3, p. 294–301, 2017.

VON ESSEN, M. R.; GEISLER, C. VDR, the Vitamin D Receptor. In: Encyclopedia of Signaling Molecules. **Springer, Cham**. [s.l: s.n.].

WAJDA, J. et al. Severity of Vitamin D Deficiency Predicts Mortality in Ischemic Stroke Patients. **Disease Markers**, v. 2019, p. 1–10, 2019.

- WANG, W. C. et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia : a multicentre , randomised , controlled trial (BABY HUG). **The Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1663–1672, 2011.
- WANG, Y.; LI, H. JIE. A meta-analysis on associations between vitamin D receptor genetic variants and tuberculosis. *Microbial Pathogenesis*, v. 130, p. 59–64, 2019.
- WARE, R. E. How I treat How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 115, n. 26, p. 5300–5312, 2010.
- WARE, R. E. et al. Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 6736, n. 17, p. 1–13, 2017.
- WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology**, v. 2009, n. 1, p. 62–69, 2009.
- WHITFIELD, G. K. et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 177, n. 1–2, p. 145–59, 2001.
- WILLIAMS, T. N.; THEIN, S. L. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 19, n. 1, p. 113–147, 2018.
- WINTERS, A. et al. Vitamin D Insufficiency is a Frequent Finding in Pediatric and Adult Patients with Sickle Cell Disease and Correlates with Markers of Cell Turnover. **Journal of Nutritional Disorders & Therapy**, v. 04, n. 02, p. 0–4, 2014.
- WON, S. et al. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.
- WYKES, C. et al. Vitamin D deficiency and its correction in children with sickle cell anaemia. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 12, p. 2051–2056, 2014.
- YAMAMOTO, H. et al. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 240–247, 1999.
- YESIL, S. et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Immune Thrombocytopenic Purpura. **Pediatr Int.**, v. 59, n. 6, p. 682–685, 2017.
- ZERWEKH, J. E. Blood biomarkers of vitamin D status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1087S-1091S, 2008.
- ZHANG, D. et al. Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 801–809, 2016.
- ZHANG, Y. et al. Metformin Induces FOXO3-Dependent Fetal Hemoglobin Production in Human Primary Erythroid Cells. **Blood**, v. 132, n. 3, p. 321–333, 2018.

ZHOU, Z.-C. et al. Association between vitamin D receptor gene Cdx2 polymorphism and breast cancer susceptibility. **Tumor Biology**, v. 34, n. 6, p. 3437–3441, 2013.

ZHOU, Z.; BEHYMER, M.; GUCHHAIT, P. Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. **Anemia**, v. 2011, p. 918916, 2011.

ZHU, J. et al. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. **Molecular brain**, v. 9, 2016.

ZMUDA, J. M.; CAULEY, J. A.; FERRELL, R. E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n. 2, p. 203–217, 2000.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE VDR E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: GABRIELA DA SILVA ARCANJO

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 94520618.3.3001.5195

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.099.858

Apresentação do Projeto:

Anemia falciforme(AF)é uma doença hemolítica caracterizada por um quadro inflamatório crônico. A inflamação, adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e subsequente dano aos tecidos contribuem para a fisiopatologia dessa doença. Esses fatores levam à oclusão de vasos na microcirculação,culminando em dor e insuficiência de múltiplos órgãos. Diversos fatores de risco emergiram como moduladores genéticos potenciais do curso clínico da doença, dentre eles,o gene do receptor da vitamina D(VDR),que é um marcador promissor na compreensão dos fenômenos fisiopatológicos da AF, devido ao seu papel nas vias de atuação da vitamina D, bem como no metabolismo ósseo. Dois dos polimorfismos mais frequentemente estudados no VDR (FokI,Cdx-2) têm sido associados à saúde óssea, inflamação e doença vascular.Segundo os autores, a influência desses polimorfismos na AF ainda não é de todo elucidada, uma vez que existem escassos trabalhos na literatura que correlacionam o VDR com esta patologia. Entretanto, levando em consideração que o VDR está presente em células endoteliais, sistemas inflamatórios e tecidos ósseos,a hipótese dos autores é de que polimorfismos específicos no VDR estejam associados à gravidade da doença, contribuindo para o desenvolvimento de um curso clínico adverso. A identificação desses novos fatores de risco genético associados às repercussões clínicas

ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 7 A 17 ANOS (Resolução 466/12)

Convidamos você (após o consentimento do (a) seu/sua pai/mãe ou responsável legal) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Gabriela da Silva Arcanjo (Endereço: Rua Marechal Manoel Luiz Osório, 264, apto.103, Várzea, Recife - PE, CEP: 50740-450 – Fone: (81) 99958-2508 – e-mail: arcanjogabriela24@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105- macbezerraufpe@gmail.com). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - aderson.araujo@gmail.com).

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via deste termo lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável. Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, um responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença grave que altera células do seu sangue, provocando dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Nós acreditamos que a existência de pequenas alterações no seu DNA possa aumentar o risco de aparecimento de algumas complicações da doença que podem prejudicar a sua saúde. Como resultado desta pesquisa não estão previstos benefícios diretos para você, entretanto, como benefício indireto a identificação dessas alterações genéticas poderá facilitar o seu tratamento evitando que complicações sérias da doença ocorram. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 8 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos. Nem você e nem seus pais (ou responsáveis legais) pagarão nada para você participar desta pesquisa, também não receberão nenhum pagamento para a sua participação, pois é voluntária. Se houver necessidade, as despesas (deslocamento e alimentação) para a sua participação e de seus pais serão assumidas ou ressarcidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, causados por conta da sua participação na pesquisa. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE, no endereço: (Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, Recife – PE, CEP: 52011-000, Tel.: (81) 3182.4771 – e-mail: cep.hemope@gmail.com).

(Assinatura do pesquisador)

Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme

ASSENTIMENTO DO (A) MENOR PARA A PARTICIPAÇÃO COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar no estudo “Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para meu/minha pai/mãe ou responsável legal.

Local e data

Assinatura do (a) menor



Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PAIS OU RESPONSÁVEIS PELOS MENORES DE 18 ANOS (Resolução 466/12)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) (ou menor que está sob sua responsabilidade) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Gabriela da Silva Arcanjo (Endereço: Rua Marechal Manoel Luiz Osório, 264, apto.103, Várzea, Recife - PE, CEP: 50740-450 – Fone: (81) 99958-2508 – e-mail: arcanjogabriela24@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105- macbezerraurfpe@gmail.com). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 99976-5136 – aderson.araujo@gmail.com), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99800-9382 - araujoarl@hotmail.com).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que o (a) menor faça parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, nem o (a) Sr. (a) ou o (a) menor serão penalizados (as) de forma alguma. O (A) Sr. (a) tem o direito de retirar o consentimento da participação dele (a) a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce de complicações clínicas da doença, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que seu/sua filho (a) doasse 8 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (entrevistas e dados laboratoriais) ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para o (a) seu/sua filho (a) participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br), ou o Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE, no endereço: (Rua Joaquim Nabuco, 171, Graças, Recife – PE, CEP: 52011-000, Tel.: (81) 3182.4771 – e-mail: cep.hemope@gmail.com)

(Assinatura do pesquisador)

Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DA CRIANÇA (OU DO MENOR DE IDADE)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável pelo (a) menor _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, autorizo a sua participação no estudo “Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para meu/minha filho (a).

Local e data

Assinatura do (a) responsável legal

Impressão Digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C – TABELA SUPLEMENTAR 1

Tabela suplementar 1: Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo Cdx-2, de acordo com modelo de herança codominante.

Características clínicas e Laboratoriais	Homozigoto Selvagem AA Total: 110 N (%)	Heterozigoto AG Total: 279 N (%)	Homozigoto Variante GG Total: 149 N (%)	p-valor
Hb F (%) mediana	6,9	8,2	9,3	
Intervalo	1,2 – 21,9	0,9 – 28,5	1,9 – 27,6	0,014*
RBC (x10 ¹² /μL) Mediana	2,55	2,62	2,52	
Intervalo	1,66 – 4,10	1,64 – 4,98	1,80 – 38,1	0,123
Hb (g/dL), mediana	7,75	7,85	7,9	
Intervalo	4,8 – 10,0	4,2 – 11,1	5,4 – 11,6	0,357
Ht (%), mediana	22,5	23,5	22,6	
Intervalo	14,7 – 32,0	15,1 – 35,1	16,4 – 33,2	0,741
VCM (fL), mediana	88,1	87,5	89,4	
Intervalo	61,8 – 116,3	53,4 – 108,5	72,2 – 114,2	0,105
WBC (x10 ⁶ /L), mediana	14,3	13,9	13,6	
Intervalo	8,0 – 25,8	3,3 – 37,9	2,1 – 48,9	0,704
PLT (x10 ⁹ /L), mediana	461	420	451	
Intervalo	179 – 802	114 – 981	142 – 973	0,323
Reticulócitos (%), mediana	10,5	9,9	11,05	
Intervalo	4,2 – 24,0	1,5 – 32,0	1,5 – 29,2	0,619
BT (mg/dL), mediana	2,30	2,18	2,31	
Intervalo	0,64 – 8,10	0,21 – 10,8	0,31 – 39,0	0,860
BI (mg/dL), mediana	1,86	1,72	1,85	
Intervalo	0,45 – 7,62	0,14 – 8,5	0,27 – 11,0	0,899
Sexo				
Feminino	56 (51%)	132 (47%)	75 (50%)	0,747
Masculino	54 (49%)	147 (53%)	74 (50%)	
Sequestro esplênico				
Sim	25 (23%)	55 (20%)	30 (20%)	0,784
Não	84 (77%)	223 (80%)	118 (80%)	
Dactilite				
Sim	29 (27%)	81 (29%)	44 (30%)	0,846
Não	80 (73%)	197 (71%)	104 (70%)	
STA				
Sim	08 (07%)	28 (10%)	19 (13%)	0,346
Não	102 (93%)	247 (90%)	129 (87%)	
Priapismo				
Sim	10 (23%)	21 (14%)	08 (11%)	0,492
Não	44 (77%)	126 (86%)	66 (89%)	
DCV				
Sim	16 (18%)	39 (17%)	16 (13%)	0,512
Não	74 (82%)	197 (83%)	111 (87%)	
DTC				
Normal	59 (65%)	158 (69%)	94 (75%)	
Condicionante	19 (21%)	49 (21%)	25 (20%)	0,256
Alto risco	12 (14%)	23 (10%)	06 (05%)	
CVO por ano, no último ano				
< 3	58 (54%)	163 (60%)	94 (64%)	
3 – 5	34 (31%)	81 (30%)	33 (23%)	0,260
> 6	16 (15%)	27 (10%)	19 (13%)	

N de complicações				
0	44 (40%)	123 (44%)	66 (44%)	0,918
1	45 (40%)	101 (36%)	56 (37%)	
2 ou mais	21 (20%)	55 (20%)	27 (19%)	

HbF: Hemoglobina fetal, RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, SEA: Sequestro esplênico agudo, STA: Síndrome torácica aguda, DVC: Doença cerebrovascular, DTC: Doppler transcraniano, CVO: Crises vasculares.

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Gabriela da Silva Arcanjo

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Mestrado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE VDR E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME
 Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
 Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2013 - 2017** Graduação em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Análise da influência de polimorfismos no gene eNOS no desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme
 Orientador: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2019 - 2019** Curso de curta duração em XVI Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares. (Carga horária: 45h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Prêmios e títulos

- 2019** Melhor Trabalho em Hematologia no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (ABHH)

Produção

Produção bibliográfica

Pr

Artigos completos publicados em periódicos

1. BATISTA, THAIS HELENA CHAVES; SOBREIRA, MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA; SANTANA, RODRIGO MARCIONILO DE; **ARCANJO, GABRIELA DA SILVA**; RAMOS, CAMILA MABEL DE ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA MARTINS; ARAUJO, ADERSON DA SILVA; ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS; COSTA, FERNANDO FERREIRA; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO ROBERTO; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI. Interaction between hemoglobin S and N-Baltimore: a case report in Pernambuco, Brazil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy.* , v.xx, p.1 - 4, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. VALERIANO, A. R.; DINIZ, M. V.; **ARCANJO, G. S.**; BEZERRA, M. A. C. ANEMIA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA: MARCADORES BIOQUÍMICOS E PERFIL HEMATOLÓGICO In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy.** , 2019. v.41.

2. OLIVEIRA, J. M. F.; BATISTA, J. V. G. F.; **ARCANJO, G. S.**; HATZLHOFER, B. L. D.; MARTINS, D. A. P.; DOMINGOS, I. F.; RAFAEL, A. B. M.; ARAUJO, A. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C. AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO SNP RS1478605 (A>G) DO GENE THBS1 COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy.** , 2019. v.41.

3. SANTANA, R. M.; BATISTA, T. H. C.; SOBREIRA, M. J. V. C.; RAFAEL, A. B. M.; SILVA, D. M. L.; **ARCANJO, G. S.**; ARAUJO, A. S.; VASCONCELOS, L. R. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIRNA-221 E DO MIRNA-126 COM O DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy;** , 2019. v.41.

4. BATISTA, T. H. C.; SANTANA, R. M.; SOBREIRA, M. J. V. C.; **ARCANJO, G. S.**; SILVA, D. M. L.; ARAUJO, A. S.; COSTA, F. F.; VASCONCELOS, L. R. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C. DIFFERENTIAL EXPRESSION OF MIR-21 AND MIR-130A AND SERUM LEPTIN LEVELS ON LEG ULCERS DEVELOPMENT IN SICKLE CELL ANEMIA In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy;** , 2019. v.41.

5. DINIZ, M. V.; VALERIANO, A. R.; **ARCANJO, G. S.**; BEZERRA, M. A. C.

TÉCNICA DE HPLC: SEU PAPEL NO DIAGNÓSTICO DAS ANEMIAS MICROCÍTICAS In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**; . , 2019. v.41.

6. BATISTA, T. H. C.; SANTANA, R. M.; SOBREIRA, M. J. V. C.; **ARCANJO, G. S.**; FALCAO, D. A.; MARTINS, D. A. P.; ARAUJO, A. S.; COSTA, F. F.; SAAD, M. J. A.; CARVALHO, B. M.; VASCONCELOS, L. R. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C. Up-Regulation of Mir-21 and Mir-130a and Serum Leptin Levels on Leg Ulcers Development in Sickle Cell Anemia In: American Society of Hematology - ASH, 2019, Orlando, FL. **Blood**. , 2019.

7. **ARCANJO, G. S.**; BATISTA, J. V. G. F.; OLIVEIRA, J. M. F.; DOMINGOS, I. F.; ARAUJO, A. B. S.; ANDRADE, A. M. G.; ANJOS, A. C.; ARAUJO, A. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C. VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SICKLE CELL ANEMIA SEVERITY In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO, 2019, Rio de Janeiro. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**; . , 2019. v.41.

Apresentação de trabalho e palestra

1. ARCANJO, G. S.

Análise de variantes genéticas no gene VDR e sua influência no desenvolvimento de complicações clínicas em pacientes pediátricos com anemia falciforme, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

2. **ARCANJO, G. S.**; BATISTA, J. V. G. F.; OLIVEIRA, J. M. F.; ARAUJO, A. B. S.; SILVA, D. M. L.; RAFAEL, A. B. M.; ALCANTARA, B. V.; BANDEIRA, M. L. S.; SILVA, J. B. R.; SANTANA, L. M. B.; BEZERRA, M. A. C.

Avaliação da influência dos polimorfismos FOKI e CDX-2 do gene VDR nas complicações clínicas de pacientes com anemia falciforme, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

3. **ARCANJO, G. S.**; BATISTA, J. V. G. F.; OLIVEIRA, J. M. F.; DOMINGOS, I. F.; ARAUJO, A. B. S.; ANDRADE, A. M. G.; ANJOS, A. C.; ARAUJO, A. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C.

VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SICKLE CELL ANEMIA SEVERITY, 2019. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. ARCANJO, G. S.; DOMINGOS, I. F.; BATISTA, J. V. G. F.; ARAUJO, A. S.; BEZERRA, M. A. C.

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE eNOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME, 2018. (Outra, Apresentação de

Trabalho)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **Ana Beatriz Lucas de Moura Rafael.** Análise da Influência de Polimorfismos no gene TGFBR3 no Desenvolvimento de Doença Cerebrovascular em Pacientes Pediátricos com Anemia Falciforme. **2019. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco**
2. **Danízia Menezes de Lima Silva.** Análise da Influência do Polimorfismo rs489347 do gene TEK no Desenvolvimento de Doença Cerebrovascular em Pacientes Pediátricos com Anemia Falciforme. **2019. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco**

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2019.** (Congresso)
Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and sickle cell anemia severity.
2. **Encontro de Biociências - EBIO, 2019.** (Encontro)
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS FOKI E CDX-2 DO GENE VDR NAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.
3. Apresentação de Poster / Painel no (a) **VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2018.** (Outra) ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE eNOS NO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME.

Organização de evento

1. **ARCANJO, G. S.**
VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2018. (Outro, Organização de

evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. LIMA, A. S. M.; **ARCANJO, G. S.**; ARAUJO, A. R. L. Participação em banca de Vinicius Santos Vilas Boas. **Variação do Número de Cópias de DNA Mitocondrial na Fase Crônica da Leucemia Mieloide Crônica**, 2019 (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco.