

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA
DO AMAZONAS - FHEMOM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
HEMATOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DOS
RECEPTORES DOS INFLAMASSOMAS NLRP1 E NLRP3 E DAS
INTERLEUCINAS IL-1 β E IL-18 E SUAS RELAÇÕES COM O ESCORE
DE GRAVIDADE EM PORTADORES DE ANAEMIA FALCIFORME**

EMERSON GARCIA DE ALMEIDA

**MANAUS-AM – 2017
EMERSON GARCIA DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas para a obtenção de grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientadora: Prof.^a Doutora Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientador: Professor Doutor Erich Vinicus de Paula

MANAUS-AM, 2017
DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos Gabriel Frantz de Almeida e Guilherme Frantz de Almeida, que são meus combustíveis pra seguir sempre aprendendo e tirar proveito do conhecimento adquirido em prol do bem estar de nossa família. E a minha esposa Sônia Rejane de Senna Frantz por me incentivar, por ser compreensiva e principalmente paciente e por jamais duvidar da minha capacidade de realização pessoal. Ofereço a vocês minha superação.

AGRADECIMENTOS

Allhamdulillah, Allah akbar.

À minha orientadora do mestrado, Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, que acima de tudo soube compreender as contingências impostas pelo cotidiano de uma aluno de mestrado, médico e chefe de família. Agradeço por ter me indicado os caminhos de novos conhecimentos na área de imunologia e biologia molecular, metodologia e pesquisa científica; matérias estas que estavam senescentes na minha memória com conceitos ainda da época da graduação, mas que rejuvenesceram.

Ao meu co-orientador, Dr. Erich Vinicus de Paula. Agradeço sua dedicação, sua disponibilidade e a sua participação no desenvolvimento deste trabalho. Suas expertises nos assuntos relacionados a doença base deste projeto e do desenvolvimento da metodologia científica foram cruciais na sua conclusão. Bastavam 30 minutos de conversas informais sobre o tema para explorarmos conhecimentos de uma bibliografia inteira.

Aos professores do Mestrado em Ciências Aplicadas a Hematologia e ao corpo administrativo do FHEMOAM.

À Nadja Garcia Pinto e Liliane Xabregas que me auxiliaram neste trabalho.

À Andrea Tarrangô, a quem tenho uma empatia gratuita.

Aos pacientes com anemia falciforme atendidos no ambulatório da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, que compartilham conosco não somente seu material genético, mas também suas experiências de vida e superação frente a uma enfermidade.

À médica e colega Dra. Rejane Nina que gentilmente acolheu-me em seu consultório.

À todos os meus colegas desta turma do mestrado, mas em especial a dois:

- Pollyana Lins: muitas vezes me tirou do “fundo do poço” com desânimos próprios da vida cotidiana de trabalho e estudo. Se estou nesta defesa agora, você é responsável por isso, amiga.
- Purim Cesar: meu colega estrangeiro. O mais brasileiro de todos os haitianos. Amigão.

E finalmente à equipe de #JETBOATAM que soube compreender minha ausência nas trilhas pelos rios desta linda região Amazônica.

“ Nada é tão difícil que o homem não possa aprender pois o
“difícil” também foi descoberto ou inventado por outro homem ”

Autor desconhecido

RESUMO

A anemia falciforme (A.F.) é uma doença hereditária causada por um ponto de mutação na cadeia da β -globina que resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 do gene (HBB; glu(E)6 val(A); GAG-GTG; rs334). A anormalidade símbolo da A.F. é a agregação e polimerização da hemoglobina S desoxigenada. Isto resulta numa drástica mudança na solubilidade da hemoglobina que leva a assumir a forma de foice, responsável por crises vaso oclusivas recorrentes acompanhadas de dor, que resultam em lesões crônicas em órgãos e tecidos. Apesar de ser uma doença monogênica, portadores de anemia falciforme tem uma substancial variedade fenotípica no qual indivíduos com o mesmo genótipos apresentam diferentes graus de gravidade. Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes que codificam as citocinas (IL) e os inflamossomas (NLRPs) podem levar a alterações funcionais na regulação transcricional. Alguns SNPs do NLRP3 levam a produção excessiva de IL-1 β que pode causar impacto negativo em diversas doenças. Especificamente, IL-1 β e IL-18 são importantes na resposta inflamatória aguda e seus SNPs tem sido considerados como preditores de prognóstico em varias condições inflamatórias. Nosso estudo tem como objetivo avaliar a frequência dos SNP's no gene dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e nos genes das IL-1 β e IL-18 e sua associação com os perfis clínicos de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme. É um estudo descritivo transversal envolvendo 21 pacientes portadores de anemia falciforme (grupo de casos) e 50 indivíduos sadios (grupo de controles). Os SNPs dos genes das IL-1 β (rs187238) e IL-18 (rs16944) foram identificados pela técnica de RFLP-PCR. Os SNPs dos genes dos inflamossomas NLRP1 (rs12150220; rs2670660) e NLRP3(rs10754558; rs35829419) foram identificados pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). A associação entre esse SNPs e os fenótipos de gravidade clínica dos indivíduos portadores de anemia falciforme foram determinados. Não houve associação dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 com indivíduos portadores de anemia falciforme em nosso grupo de estudo, assim como não houve associação desses com os polimorfismos dos genes das Interleucinas IL-1 β e IL-18 com os fenótipos de gravidades em indivíduos portadores de anemia falciforme. Em conjunto, os dados aqui apresentados constituem na afirmação de que apesar da anemia falciforme ser uma doença de caráter inflamatório crônico, só os polimorfismos de genes que influenciam na resposta imune não são suficientes para alterar o curso da gravidade da apresentação clínica.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a hereditary blood disorder caused by a point mutation in the β -globin chain of hemoglobin (HBB; glu(E)6 val(A); GAG- GTG; rs334). The hallmark abnormality of sickle cell anemia (SCA) is the polymerization of deoxygenated hemoglobin S and aggregation into fibers. This causes drastic change in hemoglobin solubility that leads to heterogeneities in cell shape and density, hemolysis, higher risk of infections and recurrent vaso-occlusive crisis (VOC) with pain, which result in chronic organ damage. Despite being a monogenic disease, patients with SCA have a substantial phenotypic variability. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine and inflammasome genes could lead to functional alterations in the transcriptional regulation. Some SNPs in NLRP3 inflammasome could lead to an increase of its production causing negative outcomes in diseases. Our study therefore aimed at evaluating SNPs IL-1 β , IL-18, NLRP1 and NLR3 genes frequency and their association with clinical severity in SCA patients. It's a transversal-descriptive study involving 21 SCA patients and 50 age, sex and ethnicity-matched healthy individuals. The SNPs were identified by PCR-RFLP for IL-1 β (rs187238) and IL-18 (rs16944) genes. The SNPs were identified by Real Time PCR (qPCR) for NLRP1 (rs12150220; rs2670660) and NLRP3(rs10754558; rs35829419) inflammasome genes. Associations between these SNPs and the clinical severity profiles of patients with SCA were then determined. The SNP of NLRP1 and NLRP3 inflammasome genes was not associated with SCA patients. In the same way, the SNP of these inflammasome the SNP's of IL-1 β and IL-18 genes was not associated with clinical severity in SCA patients. Thus, our work provides evidence that despite SCA being a chronic inflammatory disease, only genes polymorphisms are not enough to change the outcome of this disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eritrócitos falcêmicos observados no sangue periférico do paciente Walter Clement Noel	16
Figura 2 - Linha do tempo da evolução do conhecimento científico sobre a doença falciforme.	18
Figura 3 - A molécula de hemoglobina	21
Figura 4 - Organização cromossômica dos grupamentos gênicos das cadeias α e β globinas.	23
Figura 5 - Produção das cadeias globínicas de acordo com o desenvolvimento humano.	24
Figura 6 - A molécula da hemoglobina responsável pela hemoglobina normal e mutante.	24
Figura 7 - Mecanismo fisiopatológico básico da doença falciforme: a polimerização da deoxy-HbS.	25
Figura 8 - Alterações na membrana da célula falcêmica.	26
Figura 9 - Regiões de origem e abrangência dos três principais haplótipos β^S africanos e um asiático.	35
Figura 10 - Distribuição dos haplótipos β^S entre as nações com alta prevalência de anemia falciforme.	35
Figura 11 - A rede de associação entre morte, complicações clínicas e achados laboratoriais na doença Falciforme.	38
Figura 12 - As quatro principais classes de PRR's, sua localização na célula, seus ligantes e sua ação no sistema imune inato.	43
Figura 13 - Ativação do inflamassoma.	43
Figura 14 - Mecanismos de ativação do NALP3. A ativação do NLRP3 via TLR4 envolve o a ativação do NF-K β . Este induz elevada expressão do NLRP3.	46
Figura 15 - A cascata de efeitos deletérios da presença de heme livre no espaço intravascular.	47
Figura 16 - Os complexos inflamassomas NLRP1 e NLRP3	49
Figura 17 - Fluxograma do desenho do estudo; * Banco dados de Puri,Cesar.	56

Figura 18 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.....	66
Figura 19 - Valores da mediana da hemoglobina fetal (HbF) e Hemoglobina S (HbS) dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.	70
Figura 20 - Correlação entre a contagem de reticulócitos e biomarcadores laboratoriais nos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.....	71
Figura 21 - Faixa dos escores de gravidade para classificação dos fenótipos de acordo com a faixa etária em “Leve”, “Intermediária” e “Grave”	72
Figura 22 - classificação do fenótipo de gravidade com base no escore de risco nos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.	72
Figura 23 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP3 rs35829419.	79
Figura 24 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP3 rs10754558.	79
Figura 25 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP1 rs12150220.	80
Figura 26 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP1 rs2670660.....	80
Figura 27 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do da IL-1 β rs187238.	81
Figura 28 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do da IL-18 rs16944.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alterações hematológicas nos diferentes genótipos de D.F.	33
Tabela 2- Alterações eritrocitárias nos diferentes genótipos de D.F.	34
Tabela 3- Haplótipos da A.F. e seus efeitos na gravidade clínica e hematológica conforme nível de Hb F	34
Tabela 4- Alguns estudos ⁽⁵⁰⁻⁵⁷⁾ demonstrando a distribuição de haplótipos ligados ao gene da Hb S em pacientes brasileiros com doenças falciformes.	36
Tabela 5- Descrição dos <i>Primers</i> , utilizados para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP) a uma temperatura de pareamento de 60°C.	61
Tabela 6- - Características demográficas dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.	64
Tabela 7- Características socioeconômicas dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo	65
Tabela 8 - Mediana dos exames laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme e do grupo controle (pacientes saudáveis) da população de estudo.	67
Tabela 9 - Informações sobre o diagnóstico inicial e complicações da anemia falciforme na população de estudo.	68
Tabela 10 - Informações sobre complicações da anemia falciforme na população de estudo	69
Tabela 11 - Mediana dos exames laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade da população de estudo	73
Tabela 12 - Distribuição da frequência das complicações clínicas dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade da população de estudo	74
Tabela 13 - Frequência genotípica dos polimorfismos dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 do grupo de pacientes portadores de anemia falciforme.	75
Tabela 14 - Distribuição da frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 dos indivíduos portadores de anemia falciforme e dos indivíduos do grupo da população de estudo.	76

Tabela 15 - Distribuição da frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade da população de estudo.....	77
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Representação dos diferentes tipos de hemoglobina de acordo com seu principal período de produção e composição de cadeia globínica.....	24
Quadro 2 - Moléculas de adesão envolvidas na fisiopatologia da doenças falciforme.....	28
Quadro 3 - Variáveis clínicas e laboratoriais usadas para o cálculo do escore de gravidade da DF.....	39
Quadro 4 - As quatro maiores classes de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR's) e seus mais importantes ligantes.....	42
Quadro 5 - Programação do termociclador para amplificação das amostras de DNA.....	60
Quadro 6 - Descrição dos genes, referência dos SNPs, localização e kit de ensaio para genotipagem.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DF	Doença Falciforme
Hb	Hemoglobina
O ₂	Oxigênio
CO ₂	Gás Carbônico – Dióxido de carbono
CO	Monóxido de carbono
NO	Óxido nítrico
tal	Talassemia
αtal	alfa talassemia
βtal	beta talassemia
HbF	Hemoglobina Fetal
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
HbS	Hemoglobina S
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbE	Hemoglobina E
HPFH	Persistência hereditária da hemoglobina fetal
HbSS	Homozigose para hemoglobinopatia S
HbSC	Hemoglobinopatia composta S e C
HbS/β tal	Hemoglobinopatia S e beta talassemia
PS	Phosphatidylserine (fosfatidilserina)
VO	Vaso-oclusão
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (molécula de adesão de célula vascular-1)
TSP	trombospondina
BCAM/Lu	basal cell adhesion molecule-Lutheran blood group (molécula de adesão de célula basal-do grupo sanguíneo Lutheran)
ICAM-1	intercelular adhesion molecule-1 (Molécula de adesão intracelular-1)
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
STA	Síndrome Torácica Aguda
SSE	Síndrome do Sequestro Esplênico
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões Moleculares
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Perigo
TLR	Receptores Tipo Toll
NLR	Receptores tipo NOD
NLRP3	Receptor tipo NOD relacionado a proteína 3 do inflamassoma
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TNF	Fatores de Necrose Tumoral
NET	Neutrophil Extracellular Traps
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
α	Gene alfa

β	Gene beta
δ	Gene delta
ϵ	Gene epsilon
ξ	Gene zeta
γ^G	Gene gama glicina
γ^A	Gene gama adenina
ψ	Pseudogene

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1- Perspectiva Histórica da Anemia Falciforme	16
1.2- Epidemiologia da Doença Falciforme	18
1.3- As Hemoglobinopatias	20
1.3.1- A Molécula de Hemoglobina.....	20
1.3.2- A Produção das Cadeias Globínicas.....	21
1.3.3- A Hemoglobina S	22
1.4- Fisiopatologia da Anemia Falciforme	25
1.4.1- O Mecanismo de Falcização.....	25
1.4.2- Aumento da Adesão Celular ao Endotélio Vascular.....	27
1.5- Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme	28
1.5.1- No Pulmão.....	28
1.5.2- No Sistema Osteoarticular	29
1.5.3- No Cérebro	29
1.5.4- No Baço	30
1.5.5- Nos Rins	30
1.5.6- No Fígado e Vias Biliares.....	30
1.5.7- No Coração.....	31
1.6- Fatores Moduladores da Gravidade da Evolução Clínica da Anemia Falciforme	31
1.6.1- Níveis de Hb F.....	31
1.6.2- O Genótipo da Doença.....	32
1.6.4 - Fatores Adquiridos	36
1.6.5- O Escore de Gravidade da Doença Falciforme	37
1.7- O Heme na Imunidade Inata e Inflamação	39
1.8 - Papel do Sistema Imune e a Resposta Inflamatória na Anemia Falciforme.....	41
1.9- Os Inflamassomas NLRP3 e NLRP1 na Anemia Falciforme.....	44
1.10- O Polimorfismo do Gene da Região Codificadora do NLRP3	48
1.11- O Polimorfismo do Gene da Região Codificadora do NLRP1	50
1.12- Os Polimorfismos dos Genes das Regiões Codificadoras das Citocinas IL-1β E IL-18	50
2- JUSTIFICATIVA	53
3- OBJETIVOS	54
3.1- OBJETIVO GERAL.....	54
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 - Modelo de Estudo.....	55
4.2 - Tamanho amostral	55
4.3 - População do Estudo	55
4.4 - Critérios de Inclusão e Exclusão	57
4.5- Aspectos Éticos da Pesquisa.....	58
4.6- Procedimentos	58
4.6.1- Coleta de Dados e do Material Biológico	58
4.6.2 - Cálculo do Escore de Gravidade	59
4.6.3- Extração do DNA.....	59
4.6.4- Detecção do Polimorfismo do Gene da Interleucina IL-18 (SNP: rs187238; região do gene: -137 G/C) e do gene IL-1 β (SNP: rs187238) pela Técnica PCR-RFLP.....	59

4.6.5- Detecção do Polimorfismo do Gene NLRP1 (SNP: rs12150220; SNP: rs2670660) e NLRP3 (SNP: rs10754558; SNP: rs35829419) pela Técnica PCR de em tempo real qPCR)	62
4.6.6- Análise Estatística.....	63
5- RESULTADOS.....	64
5.1- Características Demográficas	64
5.2 - Características Socioeconômicas.....	65
5.3- Características laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme.....	66
5.4- Características laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme e dos pacientes sadios.	67
5.5- Informações sobre o diagnóstico inicial e complicações em indivíduos portadores de anemia falciforme	68
5.6- Informações sobre os valores da mediana da hemoglobina fetal e da hemoglobina S em indivíduos portadores de anemia falciforme.....	69
5.7- Correlação entre marcadores clássicos de gravidade de indivíduos portadores de anemia falciforme	70
5.8- Análise do escore de gravidade e sua associação com marcadores laboratoriais e clínicos em indivíduos portadores de anemia falciforme.....	71
5.9- Análise da frequência polimorfismos dos genes das interleucinas IL-1 β , IL-18 e dos polimorfismos dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 nos indivíduos portadores de anemia falciforme	74
5.10- Análise da frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 no grupo de indivíduos portadores de anemia falciforme (caso) e no grupo de indivíduos sadios (controle).	75
5.11 - Frequência dos SNP's dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 na classificação segundo o fenótipo de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme	76
5.12- Frequência dos SNP's dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 nos marcadores laboratoriais clássicos de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme	78
6- DISCUSSÃO	82
7- CONCLUSÕES.....	88
8- REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES.....	100
APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	101
APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL.....	103

1- INTRODUÇÃO

1.1- Perspectiva Histórica da Anemia Falciforme

A primeira descrição da literatura médica de um caso de anemia falciforme, em 1910, deve-se a observação de eritrócitos alongados no esfregaço sanguíneo de Walter Clement Noel, jovem negro, originário de Granada (Índias Orientais), estudante do primeiro ano do Chicago College of Dental Surgery, admitido no Presbyterian Hospital com sintomas pulmonares, cardiomegalia, albuminúria, adenopatia generalizada e icterícia, além de grave anemia.⁽¹⁾ No entanto, muito mais do que os sintomas marcantes que estavam colocando em risco a vida do paciente, o que chamou a atenção do Dr. James B. Herrick, médico responsável pelo paciente, foram as formas estranhas em que se apresentavam os eritrócitos deste paciente as quais foram alcunhadas, pelo próprio médico e autor do artigo científico, de “hemácias em forma de foice - figura 1.”⁽¹⁾ Dados os sintomas do paciente descritos pelo médico, este não tinha certeza, naquela época, se as condições hematológicas do paciente tratavam-se de uma doença *sui generis* ou manifestações clínicas de uma outra doença. Nos 15 anos seguintes à publicação do artigo científico, vários outros casos similares foram descritos, dando suporte à ideia de que se tratava de uma nova entidade, fornecendo evidências suficientes aos pesquisadores para uma descrição preliminar clínica e patológica.⁽²⁾

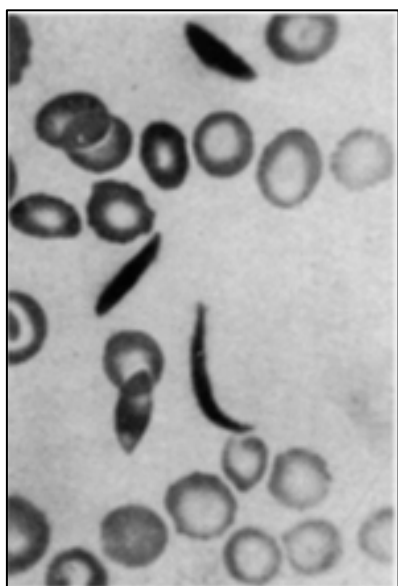


Figura 1 - Eritrócitos falcêmicos observados no sangue periférico do paciente Walter Clement Noel
Fonte: Herrick JB (1910).

Em 1927, Hahn e Gillespie sugeriram que fenômeno da falcização poderia ser dependente da tensão de oxigênio. Estes pesquisadores demonstraram em um excelente experimento *in vitro* que mudanças na forma eritrocitária poderiam ser induzidas saturando uma suspensão celular com dióxido de carbono.⁽³⁾ Essa sugestão foi aceita por Scriver e Waugh em 1930, que provaram este conceito induzindo uma estase venosa em uma extremidade do paciente, mais precisamente o dedo, usando uma liga elástica. Eles mostraram que a hipóxia induzida pela estase aumentava dramaticamente a proporção de eritrócitos em forma de foice de aproximadamente 15% para mais de 95%.⁽⁴⁾

Como base nestes estudos originais, em 1945, Linus Pauling foi o primeiro a postular a hipótese de que a doença poderia ser originada de uma anormalidade na molécula da hemoglobina. Esta hipótese foi validada por ele mesmo em 1949, pela demonstração do diferencial de migração da hemoglobina falcêmica em relação a hemoglobina normal por meio da técnica de eletroforese de gel.⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Nos anos de 1949 a 1951 em dois estudos separados, Neel J.V. e Beet E.A. elucidaram a herança autossômica recessiva da doença falciforme, no qual mostram que o estado heterozigoto do gene falcêmico não apresentam significantes sintomas *versus* o estado homozigótico do gene falcêmico em indivíduos notadamente sintomáticos.⁽⁷⁾

Watson e colaboradores (1948) postularam que a presença da hemoglobina fetal (HbF) prolonga o início da falcização em recém-nascidos. Hoje sabe-se que a presença de HbF no sangue é um dos fatores que diminuem as crises falcêmicas em pacientes adultos.⁽⁸⁾

Finalmente, em 1958, Ingram V.M. demonstrou a diferença na sequência de aminoácido em uma parte da cadeia polipeptídica da hemoglobina, conferindo assim o termo hemoglobina S (HbS), a hemoglobina mutante, diferente da Hemoglobina A (HbA) , a hemoglobina normal.⁽⁹⁾

Desde então, houve uma rápida expansão de informação sobre a doença falciforme, porém há muito para ser explorado.

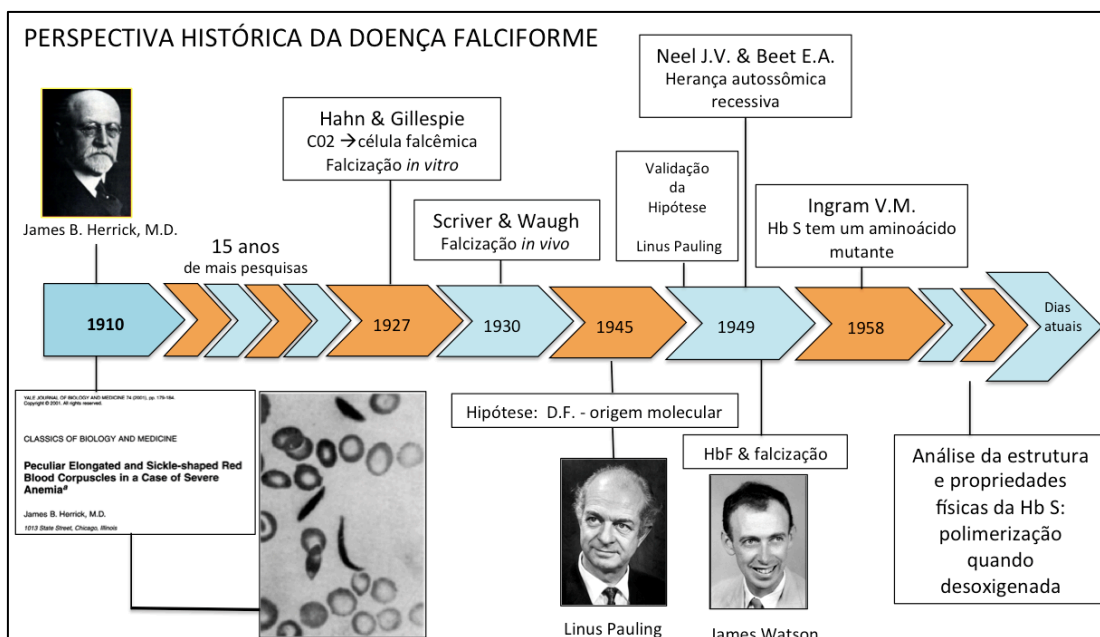


Figura 2 - Linha do tempo da evolução do conhecimento científico sobre a doença falciforme.

Fonte: Frenette PS, Atweh GF (2007)

1.2- Epidemiologia da Doença Falciforme

A doença falciforme (DF) é uma alteração genética caracterizada por um tipo de hemoglobina mutante designada de hemoglobina S (Hb S), que provoca distorção nos eritrócitos, fazendo-os tornar a forma de “foice” ou de “meia-lua”. A expressão doença falciforme define as hemoglobinopatias nas quais pelo menos uma das hemoglobinas mutantes é a Hb S. É chamado de portador de anemia falciforme, o paciente que apresenta o gene da hemoglobina S em homozigose (cuja representação é Hb SS), e portador do traço falcêmico o indivíduo que apresenta a combinação do gene da hemoglobina S, em heterozigose, com a hemoglobina normal Hb A (representação: Hb AS).⁽¹⁰⁾

Existe também a expressão clínica e patológica caso o gene da Hb S se apresente em qualquer heterozigose mista. Nesta condição, a combinação do gene da Hb S com genes determinantes de variantes da hemoglobina como a hemoglobina C (Hb C), a hemoglobina D (Hb D) ou de hemoglobinas anômalas causadoras de outras formas de anemia hereditária tipo a talassemia alfa ou beta, teremos o que se denomina doença falciforme SC (cuja representação é Hb SC), doença falciforme SD (Hb SD), doença falciforme com talassemia alfa ou beta (Hb S-talassemia α ou β) com sintomatologia semelhante ou mais grave a da anemia falciforme.⁽¹¹⁾

Com base em publicações da Organização Mundial de Saúde (OMS- Bulletin of the World Health Organization, 2001, 79: 704-712), acredita-se que, mundialmente, 270 milhões de pessoas possuam genes que determinam a presença de Hb anormais. Estima-se que 300 a 400 mil crianças nascidas vivas apresentam anemia falciforme ou alguma forma de talassemia grave.⁽¹²⁾

A AF surgiu no continente africano e sua mutação genética teve sua origem em um evento micro-evolutivo que ocorreu a milhares de anos como consequência de um processo seletivo entre algumas populações humanas e o protozoário causador da malária (*Plasmodium falciparum*)⁽¹³⁾. A seleção natural favoreceu os indivíduos que possuíam a mutação em sua hemoglobina (representada por Hb S), em detrimento da hemoglobina considerada normal (representada por Hb A). Os indivíduos heterozigotos (Hb AS), são mais resistentes à infecção pelo Plasmodium e desenvolvem a forma mais branda da doença, que permite a sobrevivência de um maior número de indivíduos. À medida que o evento de fluxo gênico entre as populações ocorria – como ainda ocorre –, em algumas gerações, os heterozigotos (AS) geravam descendentes homozigotos (SS), herdando um alelo Hb S do pai, outro da mãe, e outros heterozigotos, segundo proporções Mendelianas.⁽¹³⁾

A doença chegou nas Américas através do tráfico negreiro e posteriormente dispersou-se pela miscigenação entre diversos grupos humanos no continente ao longo do tempo.⁽¹⁴⁾

No Brasil, do mesmo modo, a dispersão da doença ocorreu devido a introdução de inúmeras tribos africanas que vieram para realizarem trabalho escravo nas indústrias de cana de açúcar do Nordeste e, posteriormente, para a extração de metais preciosos em Minas Gerais. A partir da abolição da escravatura, o fluxo migratório se expandiu para várias regiões do país e assim ocorreu o início do que Ruiz⁽¹⁵⁾ chama de miscigenação racial, favorecendo a dispersão desses genes anormais da Hb S, fazendo da doença falciforme a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil.⁽¹⁶⁾ As prevalências referentes à doença falciforme em diferentes regiões brasileiras permitem estimar a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da Hb S e mais de 8 mil afetados com a forma homozigótica (Hb SS).⁽¹⁷⁾ A anemia falciforme chega a acometer 0,1 a 0,3% da população negra.^(18,19) Dados dos programas estaduais de triagem neonatal mostram que no Estado da Bahia, a incidência de DF é de 1:650, enquanto a do traço falciforme é de 1:17. No Rio de Janeiro, 1:1300 para a doença

e 1:20 de traço. Em Minas Gerais, é na proporção de 1:1400 com doença e de 1:30 com traço falciforme. ⁽²⁰⁾

Na Amazônia, segundo Pante de Souza et al. (1998), a ocorrência do gene da Hb S também está relacionada ao processo de migração de escravos desde meados do século XVIII, resultante do tráfico inter-regional de negros provenientes de outras regiões como o Nordeste. Pesquisas recentes ⁽²¹⁾ sobre a frequência de haplótipos em diferentes municípios e Estados do Brasil, mostra que, na cidade de Belém-PA a maior frequência do gene S tem provável origem do grupo etno-linguístico Banto (África Subsaariana), com cerca de 66,7% dos haplótipos, seguida por uma porção provenientes de Benin (África Ocidental), com 30%, e outra do Senegal (Costa Oeste da África), com 3,3% de frequência gênica.

A letalidade da DF é de 80% em crianças com menos de 5 anos de idade que não recebem os cuidados de saúde necessários decorrentes de complicações relacionadas diretamente à doença e que não utilizam do uso sistemático do programa vacinal, associado ao uso da penicilina profilática. ⁽¹⁰⁾ Sendo assim, em virtude da prevalência e da mortalidade que se apresenta, a DF tem sido apontada como uma questão de saúde pública. ⁽²²⁾

1.3- As Hemoglobinopatias

1.3.1– A Molécula de Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) humana é uma proteína presente no interior dos eritrócitos que tem como principal função o transporte de gases como o oxigênio (O_2), o monóxido de carbono (CO) e o Óxido Nítrico (NO) os quais possuem importantes papéis biológicos. Sua estrutura é de uma proteína globular, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias tipo alfa (alfa- α e zeta- ξ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ e épsilon- ϵ) (Figura 3). Cada cadeia globínica está quimicamente unida a um grupo prostético de ferro, ferroprotoporfirina IX (heme), o qual se liga reversivelmente ao O_2 , conferindo à molécula a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o oxigênio para tecidos. ⁽²³⁾

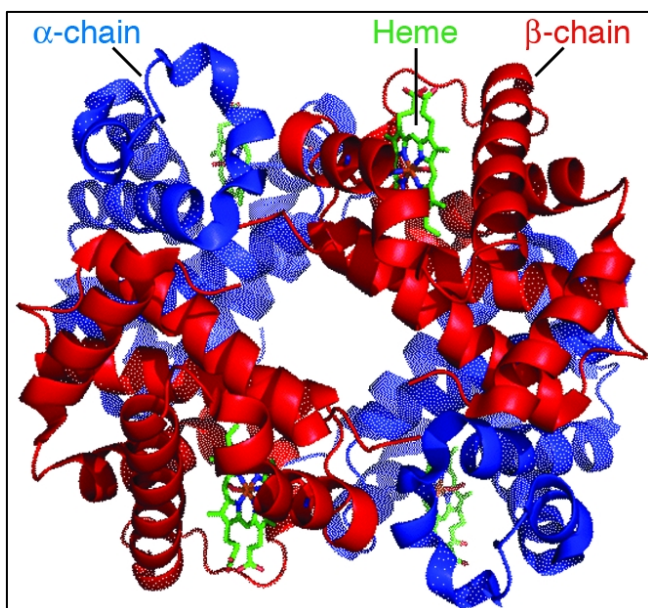


Figura 3 - A molécula de hemoglobina

A Hb é uma molécula tetramétrica de 574 aminoácidos. Nos adultos, a Hb normal (HbA) é composta por duas globinas tipo alfa (α) e duas tipo beta (β) de formato globular, além dos grupos heme, que são compostos por um anel porfirínico no qual se acomoda o átomo central de ferro.

Fonte: Claiborn K. (2010)

1.3.2– A Produção das Cadeias Globínicas

A origem das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos (clusters) de genes nos cromossomos 11 e 16, na ordem cronológica em que são expressos (sentido $5' \rightarrow 3'$) dependendo de qual dos três períodos de desenvolvimento se encontra o ser humano (períodos estes: embrionário, fetal e adulto) (Figura 4). No braço curto do cromossomo 16, em um seguimento de DNA de 35 kb, localizam-se os genes zeta (ξ), que codificam a cadeia ξ globínica, dois pseudogenes, ($\psi\xi$) e ($\psi\alpha$), e os genes alfa 1 ($\alpha 1$) e alfa 2 ($\alpha 2$), que no ser humano, estão duplicados, devendo-se este fato provavelmente à duplicação gênica no decorrer do processo evolutivo. Estes genes duplos são responsáveis pela codificação das cadeias globínicas alfa. No cromossomo 11 localiza-se o complexo dos genes beta, com uma extensão superior a 640kb, onde se observam, no sentido $5' \rightarrow 3'$, os genes épsilon- ϵ , gama glicina- γ^G , gama adenina- γ^A , um pseudogene ($\psi\beta$), e os genes delta- δ e beta- β .^{(24) (25)(3)}

No período embrionário, até o 3^o mês do início da evolução gestacional, os genes ξ e ϵ são de início primariamente expressos no saco vitelínico, região para-aórtica, e em seguida no fígado, cuja combinação resulta na formação de hemoglobinas Gower-1 ($\xi_2\epsilon_2$), Gower-2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\xi_2\gamma_2$). Em seguida há a expressão dos 2 α -genes e do 2 γ -genes ($\gamma^G \gamma^A$) que combinam para formar a hemoglobina fetal (HbF – $\alpha_2\gamma_2$) que prepondera durante toda a vida intrauterina decaindo logo após os primeiros seis meses de vida. Ainda no período fetal, mais precisamente por volta da 25^a semana da gestação, há a produção das cadeias delta (δ) que combinadas com as cadeias alfa, resulta na hemoglobina A2 (HbA2). As concentrações de HbA2 mantem-se reduzidas até o nascimento, aumentando lentamente e estabilizam-se por volta do sexto mês de vida. Ao nascimento, embora os genes das cadeias alfa permaneçam bastante ativas, os genes das cadeias gama deixam de ser ativos dando lugar a síntese dos genes da cadeia beta (δ e β), cuja combinação resulta na hemoglobina A (HbA). No adulto o fenótipo de HbA e HbA2 são predominantes. Em alguns casos, a expressão da gama-globina persiste em células eritrocitárias em adultos. Esse estado assintomático é conhecido como Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal(sigla em inglês: HPFH) (figura 5 e Quadro 1).⁽²³⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾

Nos eritrócitos de adultos normais, a HbA ($\alpha_2\beta_2$) responde por aproximadamente 97% das proteínas presentes na molécula, a HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) por 2% , e a HbF ($\alpha_2\gamma_2$) por 1%.⁽²⁶⁾

1.3.3– A Hemoglobina S

A célula falcêmica (hemoglobina S – onde a letra S deriva da palavra inglesa sickle, que em português se traduz como foice) é originada por uma mutação pontual do códon GAG da sexta posição do gene da cadeia beta, no braço curto do cromossomo 11, no qual ocorre a troca de uma adenina por uma timina levando a síntese de uma valina ao invés do ácido glutâmico na cadeia polipeptídica (Figura 6). A hemoglobina mutante (α_2/β^S_2) possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal devida à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (por causa da perda do ácido glutâmico). Isso leva a propensão de formar polímeros quando a hemoglobina está desoxigenada e quando encontra-se em altas concentrações intracelulares, além da presença ou ausência da hemoglobina fetal (HbF). Como consequência da formação dos polímeros, o eritrócito sofre deformação e enrijecimento de sua membrana celular, levando a seu formato de eritrócito em forma de foice.⁽²⁸⁾⁽²⁴⁾

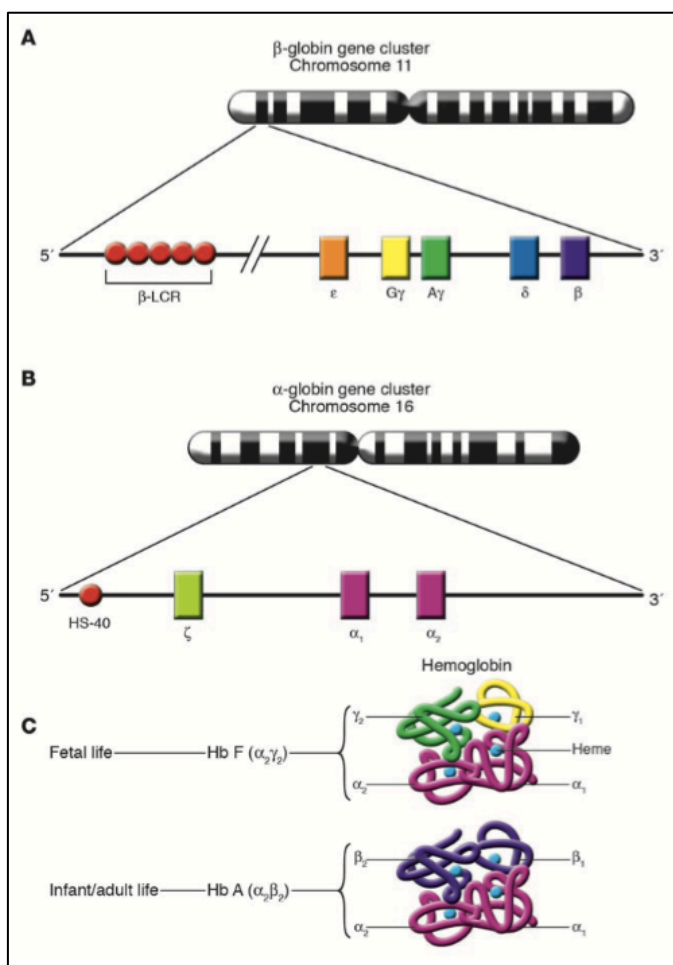


Figura 4 - Organização cromossômica dos grupamentos gênicos das cadeias α e β globinas.

(A) Os genes dos grupamentos beta-globina (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β) estão presentes no cromossomo 11 na mesma ordem que eles são expressos durante o desenvolvimento. (B) Os genes dos grupamentos α -globina (ζ , α_1 e α_2) estão presentes no cromossomo 16 na mesma ordem que eles são expressos durante o desenvolvimento. (C) Durante a vida fetal, Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) é o tipo predominante de hemoglobina. “Hemoglobin switching”, na qual a palavra inglesa neste contexto se traduz por mudança, refere-se ao processo de desenvolvimento que leva ao silenciamento da expressão genética da cadeia γ -globina e a recíproca ativação da expressão genética da β -globina adulta. Isso resulta na substituição do HbF pelo HbA ($\alpha_2\beta_2$) o qual é a hemoglobina predominante na vida adulta.

Fonte: Frenette PS, Atweh GF (2007)

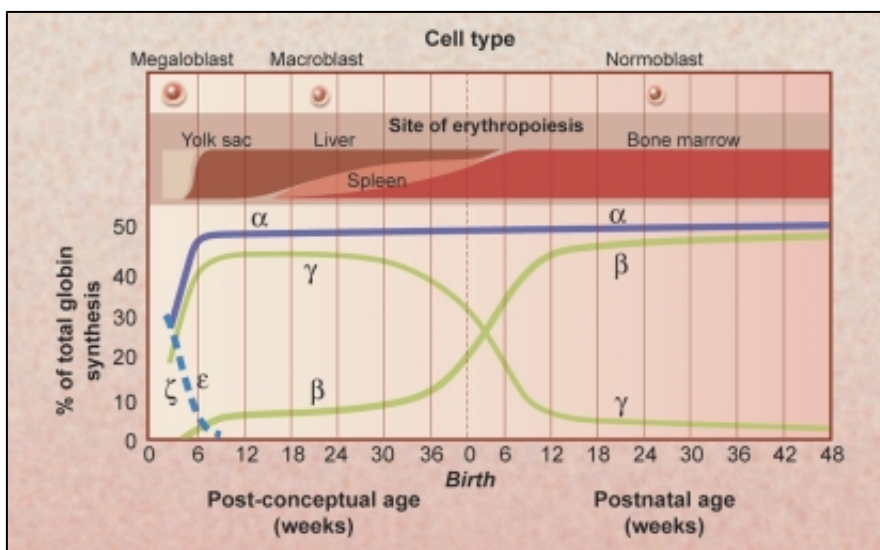


Figura 5 - Produção das cadeias globínicas de acordo com o desenvolvimento humano.

Também são mostrados os principais locais de eritropoese e tipos de conteúdos da hemoglobina durante este período. Estas análises são amplamente baseadas em observações de amostras clínicas feitas por Huehns *et al* nos anos de 1960.

Fonte: Schechter AN (200)

Quadro 1 – Representação dos diferentes tipos de hemoglobina de acordo com seu principal período de produção e composição de cadeia globínica

Tipo de hemoglobina	Período preponderante de síntese	Cadeias globínicas
Gower-1	Embrião/até o 3º mês de gestação	$\xi 2 \epsilon 2$
Portland	Embrião/até o 3º mês de gestação	$\xi 2 \gamma 2$
Gower-2	Embrião/até o 3º mês de gestação	$\xi 2 \gamma 2$
Hb Fetal	Feto/até o 6º mês de gestação	$\alpha 2 \gamma 2$
HbA2	Feto/vida adulta	$\alpha 2 \delta 2$
HbA	Vida adulta	$\alpha 2 \beta 2$

Fonte: Neto G de G, Pitombeira M da S (2003)

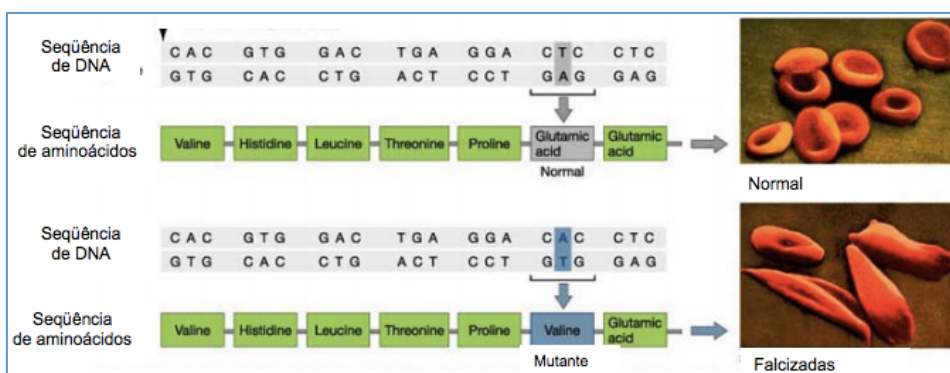


Figura 6- A molécula da hemoglobina responsável pela hemoglobina normal e mutante.

Fonte: Adapta de Neto G de G, Pitombeira M da S (2003)

1.4- Fisiopatologia da Anemia Falciforme

1.4.1- O Mecanismo de Falcização

No processo de desoxigenação, o qual ocorre quando o eritrócito alcança a microcirculação, a molécula de Hb sofre uma modificação da sua conformação molecular. Na hemoglobina mutante HbS, a troca do ácido glutâmico hidrofílico na posição 6 da cadeia da beta-globina pelo resíduo de valina hidrofóbica faz com que este último estabeleça interações com outros resíduos também hidrofóbicos dentro da cadeia de β -globina de outra deoxy-HbS molécula adjacente. O aminoácido valina interage com o receptor fenilalanina (b-85) e leucina (b-88) e essa interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros, compostos por 14 fibras de dexosiemoglobinas, enoveladas entre si, num processo denominado nucleação, que progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimétrica, na forma de um eixo axial no interior da célula. O polímero se forma e se estende em fibras helicoidais, se agrupando lado a lado, enrijecendo-se – (Figura 7). Este processo necessita de um determinado tempo para ser iniciado, sendo que este tempo, que dura da desoxigenação até a formação do polímero, é denominado de tempo de atraso (“delay time”), o qual é inversamente proporcional a concentração intracelular de HbS. Está criado assim o mecanismo de transformação da clássica forma de eritrócito em uma nova estrutura celular em forma de foice. ⁽²⁹⁾

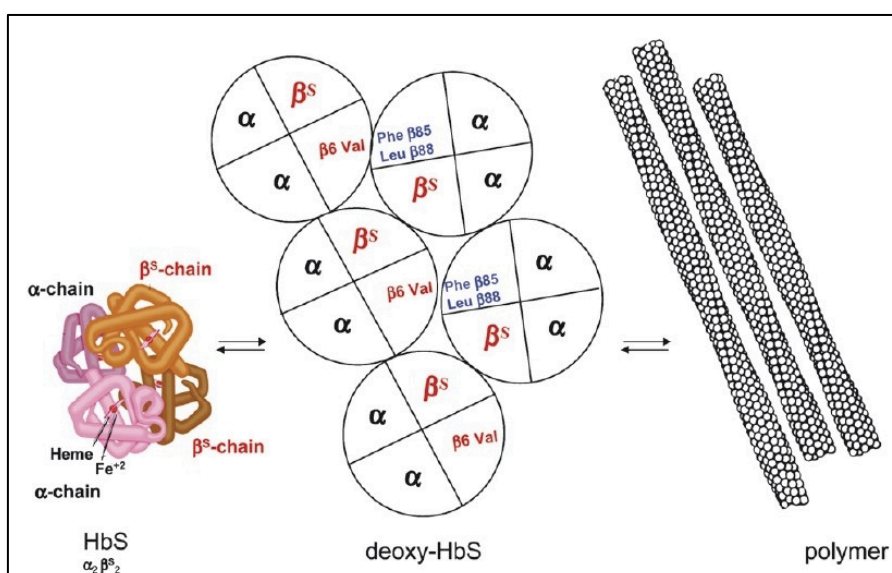


Figura 7 - Mecanismo fisiopatológico básico da doença falciforme: a polimerização da deoxy-HbS.

No estado de baixa tensão do oxigênio, a deoxy-HbS polimeriza-se e organiza-se em uma longa fibra que deforma, enrijece e fragiliza o eritrócito.

Fonte: Odièvre M-H, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. (2011)

A formação destas longas fibras de polímeros desencadeiam uma cascata de várias outras anormalidades celulares o qual participam na sua totalidade no mecanismo fisiopatológico (Figura 8). A membrana do eritrócito possui vários canais de transporte de íons para manter a hidratação celular. Esta disfunção da homeostase é resultante da ativação de alguns canais iônicos, tal como os mais importantes, os canais de co-transporte de íons de potássio e cloro (sistema de co-transporte de K-Cl) e o canal K-Ca dependente (também conhecido como canal de Gardos). O primeiro, quando ativado, permite que o K^+ e o Cl^- deixem a célula, seguidos pela água, o que resulta em desidratação. O eritrócito desidratado, por sua vez, pelo aumento da concentração intracelular da HbS, favorece a deoxy-HbS polimerização. O canal de Gardos é um canal de efluxo de K^+ , ativado pelo aumento intracelular de Ca^{++} decorrente da falcização e da desoxigenação dos eritrócitos. Como ocorre no sistema K-Cl, a saída de K^+ é seguida pelo efluxo de água, desidratação celular e aumento da concentração interna de HbS. Esta mudança estrutural e funcional da HbS segue-se com a formação de concentrados de hemímeros no lado interno da membrana juntamente com proteínas do citoesqueleto, em particular, proteínas da banda 3. Este processo vem juntamente com a perda do heme a com a liberação do Fe^{3+} , o qual promove a existência de um microambiente oxidante. A assimetria normal da membrana fosfolipídica é quebrada com a exposição de fosfatidilserina aniônica na superfície celular. A IgG anti-banda 3 acumulada sobre os agregados de proteínas da banda3 induzem eritrofagocitose por macrófagos. Finalmente, todas estas mudanças na membrana dão origem a produção de micropartículas.⁽³⁰⁾

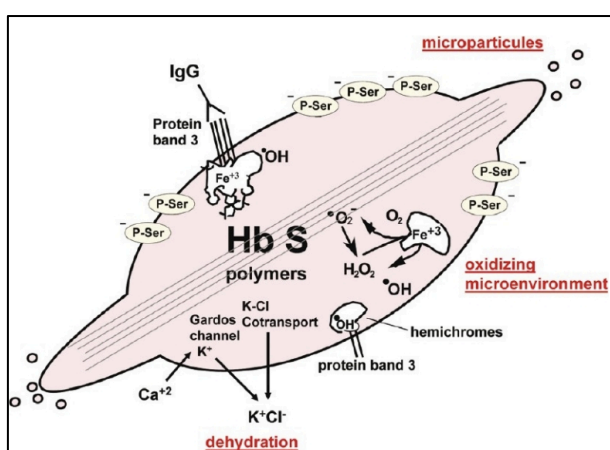


Figura 8 - Alterações na membrana da célula falcêmica. A formação de polímeros na deoxy-HbS desencadeia uma série de mudanças na membrana eritrocitária. Canais iônicos são afetados e esta anormalidade em suas funções são responsáveis por desidratação celular que, num círculo vicioso, favorece a polimerização da deoxy-HbS.

Fonte: Odièvre M-H, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. (2011)

1.4.2- Aumento da Adesão Celular ao Endotélio Vascular

As células endoteliais ativadas expressam moléculas como VCAM-1 (*vascular-cell adhesion molecule*) e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), facilitam a adesão de células sanguíneas ao endotélio. As hemácias falcizadas são mais aderentes ao endotélio vascular e às proteínas da matriz extracelular do que as hemácias normais. Essa adesão dos eritrócitos ao endotélio vascular é provavelmente o mecanismo primário pelo qual as alterações moleculares que ocorrem nas hemácias são transmitidas aos tecidos. Essa adesão pode causar obstrução e hipóxia local com agravamentos da falcização, ao mesmo tempo que desencadeia os fenômenos inflamatórios com a mobilização de células inflamatória agudas (granulócitos) e crônicas (monócitos), que serão mais intensos se houver necrose dos tecidos. Também há alterações da coagulação sanguínea e alterações no metabolismo do óxido nítrico (NO). Os eritrócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão (PS, CD36, CD47, CD49d e BCAM/LU) na superfície externa da membrana celular do que dos eritrócitos normais (Quadro 2). Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, propagando o processo de vaso-oclusão (VO). Algumas dessas moléculas (CD36 e CD49d) estão expressas somente nos reticulócitos. Como essas células jovens são mais aderentes e estão presentes em maior número nesses pacientes, eles desempenham papel importante no fenômeno vaso-oclusivo.^{(31) (32)}

Os neutrófilos ativados expressam CD64, integrinas ($\alpha_L\beta_2$ e $\alpha_M\beta_2$), receptor da trombospondina (CD36), moléculas de adesão leucócito-endotélio (L-selectinas) e leucócitos-plaquetas [ligante da P-selectina (PSGL-1)], que favorecem a adesão ao endotélio, recrutam plaquetas e outros neutrófilos para o sítio de inflamação, além de secretarem H_2O_2 que lesa o endotélio vascular. As plaquetas ativadas dos pacientes com doença falciforme expressam maior quantidade de P-selectina (CD62p), que favorece a ligação do endotélio e com neutrófilos via PSGL-1 e de $\alpha_V\beta_3$ (CD61) receptor da vitronectina. A ativação plaquetária também aumenta a afinidade da GP1b-IX-V pelo fator de von Willebrand e da GPIIb-IIIa pelo fibrinogênio.⁽³³⁾

Quadro 2 - Moléculas de adesão envolvidas na fisiopatologia da doença falciforme

Moléculas de adesão	Ligante
Fator de von Willebrand	GPIb, $\alpha_v\beta_3$
CD36	Trombospondina
CD47	$\alpha_v\beta_3$
$\alpha_4\beta_1$	VCAM-1, fibronectina
BCAM/Lu	Lamina (ECM)
Fosfadilserina	$\alpha_v\beta_3$

Fonte: Zago MA, Pinto ACS (2007)

1.5- Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme

A mais comum e precoce manifestação clínica da anemia falciforme é a dor aguda ocasionada pelos fenômenos de vaso-oclusão. Metade dos pacientes apresentam estas crises por volta dos 5 anos de idade. A dor é geralmente descrita como uma dor óssea embora pode envolver qualquer órgão do corpo. Em adolescentes, as crises vaso-oclusivas mais comumente se manifestam como dactilite, um inchaço geral na parte distal de mãos e pés, juntamente com uma inflamação que envolve as articulações dos dedos desses membros. Outros problemas na doença falciforme incluem osteomielite, osteonecrose, infarto esplênico, sequestro esplênico, síndrome torácica aguda, acidentes vasculares cerebrais (AVC's), necrose papilar e insuficiência renal. Faremos uma abordagem das manifestações clínicas com ênfase nos principais órgãos afetados pela doença. (34)

1.5.1- No Pulmão

O acometimento pulmonar na DF é a segunda causa principal de hospitalização (após as crises de dor aguda). A pneumonia apresenta-se em doentes falcêmicos dos mesmo modo como uma típica pneumonia na população geral. No entanto, estima-se que crianças com DF são 100 vezes mais suscetíveis a desenvolver a doença, o que justifica profilaxia antibiótica com penicilina via oral que se inicia por volta dos 3 meses e continua pelo menos até os 5 anos de idade. A pneumonia pode levar a síndrome torácica aguda (STA) que é caracterizada por uma imagem de consolidação pulmonar evidenciada por exames de imagem e algumas combinações clínicas que incluem febre, dor torácica, tosse, dispneia e taquipneia (sinais claros de comprometimento pulmonar). Sua causa ainda não é totalmente compreendida, mas tem sido identificados agentes implicados no seu surgimento e evolução incluindo infecções, embolia gordurosa pulmonar além de fenômenos de oclusão vascular pulmonar. Os agentes

infeciosos incluem *S. Pneumoniae*, *S. Aureus*, *H. Influenzae*, *Klebsiela* também agentes virais. O infarto ósseo é apontado como causa de embolia gordurosa. Outros fatores ligados a STA incluem uso de opioides, edema pulmonar e parvovirus B19 (que pode levar a infarto da medula óssea e causar embolia). STA pode evoluir para angustia respiratória e morte.(35)

1.5.2- No Sistema Osteoarticular

O envolvimento do osteoarticular é um dos mais comuns nos pacientes com doença falciforme e inclui desde a hiperplasia medular reativa ao quadro anêmico até as complicações como infartos ósseos/medulares e infecções além da dactilite (síndrome mão-pé), sendo o primeiro como consequência das crises vaso-oclusivas que são particularmente comuns na medula óssea e nas epífises e o segundo relacionada a vários mecanismos de susceptibilidade aumentada a infecções na DF (hipoesplenismo, alterações do sistema complemento e áreas de necrose óssea). Os infartos ósseos e medulares podem manifestar-se clinicamente com dor, edema e eritema locais ou podem ser silenciosos. Nos casos sintomáticos, febre e leucocitose também podem estar presentes, dificultando o diagnóstico diferencial com processos inflamatórios. O envolvimento isquêmico de músculo e fâscias é um achado menos comum nestes pacientes, mas pode ser encontrado. A mionecrose pode causar alteração do tamanho e da forma da musculatura afetada. A osteomielite é uma grave complicação da DF. É mais comum na região diafisária e na população de pacientes acometidos geralmente é mais encontrado no fêmur, tibia e úmero.(36)

1.5.3- No Cérebro

Acidentes vasculares cerebrais, atrofia e debilidade cognitiva são as principais consequências de lesões neurológicas da DF. Aproximadamente 25% de todos os pacientes com DF terão uma lesão neurológica ao longo da vida. Muitas crianças irão vivenciar o “infarto silencioso” (definido como ausência de sintomas clínicos com achados de infarto à RNM). O infarto silencioso é duas vezes tão comum quanto infartos com manifestações clínicas e deve ocorrer acima de 22% em crianças por volta dos 12 anos de idade. Outros problemas menos comuns incluem hemorragias intraparenquimatosas e subaracnóideas e aneurismas cerebrais. Os acidentes vasculares cerebrais em pacientes com DF são geralmente isquêmicos. Acredita-se que a isquemia seja resultado do fenômeno de falcização eritrocitária seguido de toda cascata de consequências fisiopatológicas deste processo resultando em oclusão de vasos cerebrais. (37)

1.5.4- No Baço

A Síndrome do Sequestro Esplênico (SSE) é caracterizado pelo rápido preenchimento de sangue no interior deste órgão, resultando em depleção do volume intravascular e queda nos valores do hematócrito (uma queda de >2 g/dl é considerado significativo). Quando a síndrome do sequestro esplênico é de intensidade média, a criança pode apresentar uma palidez cutânea branda, letargia, aumento do volume do baco, taquicardia e dor no quadrante superior direito. Quando severa, as crianças apresentam rápido aumento do volume do baco, dor intensa por todo o abdômen, sede, letargia, palidez mais acentuada, taquicardia além de taquipneia. Esta condição pode evoluir rapidamente (dentro de horas) para colapso cardiovascular e morte. O tratamento consiste em transfusão sanguínea; ocasionalmente, a esplenectomia é realizada, especialmente em pacientes com recorrente SSE.(38)

1.5.5- Nos Rins

Os rins dos pacientes com DF apresentam um aumento no fluxo plasmático e um aumento da taxa de filtração glomerular. É postulado que estas mudanças ocorrem devido ao surgimento de hipersecreção compensatória de prostaglandina e óxido nítrico com efeito vasodilatador. O glomérulo é largo e hiperfiltrante e como consequência desenvolve glomeruloesclerose. A glomeruloesclerose pode levar a proteinúria (aproximadamente em mais de 12% em adolescentes), síndrome nefrótica (aproximadamente em 4% dos pacientes) e em insuficiência renal (estima-se ocorrer em 4% a 18% dos pacientes). Injúria vascular e trombozes no leito vascular renal também são causados por falcização de eritrócitos nos vasos medulares (vasa recta). Deste modo, dentre as manifestações renais mais conhecidas associadas a nefropatia falciforme, as principais incluem a dificuldade de concentração da urina (sob condições de privação de água), acidificação deficiente da urina, hematúria e proteinúria associada à hiperfiltração glomerular. (39)

1.5.6- No Fígado e Vias Biliares

As alterações agudas causadas por processo de falcização são caracterizadas por dor no quadrante superior direito e icterícia, podem apresentar náuseas, hepatomegalia dolorosa e febre. O sequestro hepático caracteriza-se por dor no quadrante superior direito, hepatomegalia, queda no hematócrito, aumento dos reticulócitos e pouca alteração das enzimas hepáticas. A colestase intra-hepática resulta de um processo de falcização intra-sinusoidal, hipoxemia e isquemia dos hepatócitos com consequente edema dos hepatócitos e

colestase intracanalicular. As manifestações clínicas são semelhantes as crises agudas de falcização hepática, com dor no quadrante superior direito, náusea, vômito, hepatomegalia dolorosa, febre e leucocitose. Entretanto, ocorre aumento acentuado de bilirrubina, acompanhado de insuficiência renal, coagulopatia e encefalopatia hepática.(40)

A elevada excreção constante de bilirrubinas resulta em formação frequente de cálculos biliares. A colecistectomia deve ser realizada em pacientes com sintomas decorrentes de colelitíase e evitar dúvidas no diagnóstico diferencial entre outras complicações hepáticas e cólica biliar ou colecistite. A hemocromatose correlaciona-se as frequentes transfusões somado a hemólise crônica própria da DF.(41)

1.5.7- No Coração

As alterações cardiovasculares relacionadas às DF têm sido reconhecidas com mais frequência e incluem aumento da área cardíaca, isquemia miocárdica, disfunção biventricular, hipertensão pulmonar, entre outras. Elas têm sido atribuídas principalmente à anemia hemolítica crônica presentes neste pacientes ou consideradas reflexo das alterações pulmonares ou do depósito de ferro secundário às transfusões de sangue. Atualmente acredita-se que as manifestações cardíacas incluem uma miocardiopatia específica causada pela lesão direta do coração pela doença. A sobrecarga de ferro, secundária às transfusões sanguíneas, poderia agravar o acometimento cardíaco, mas este parece não ser um evento frequente nos pacientes com DF.(40)

1.6- Fatores Moduladores da Gravidade da Evolução Clínica da Anemia Falciforme

1.6.1- Níveis de Hb F

As elevações de Hb F tem papel muito importante para modular o quadro das doenças falciformes, pois o papel inibitório que a Hb F exerce sobre o processo de falcização, reduz a gravidade das manifestações clínicas. Os níveis de Hb F em adultos são determinadas geneticamente; a presença de alelos que determinam ligeiras elevações de Hb F são comuns e não associadas a manifestações clínicas, mas, quando presentes em um indivíduo com doença falciforme, provocam uma elevação de Hb F maior do que a habitual na doença. Também existem formas de persistência hereditária de Hb F heterocelular, mais raras, mas que podem se associar à doença falciforme. ⁽³¹⁾

1.6.2- O Genótipo da Doença

Algumas características genéticas têm grande importância na gravidade clínica da doença, porque determinam a concentração intracelular de Hb S. A elevada concentração de Hb S é essencial para que a polimerização da Hb S se inicie e se propague rapidamente, provocando a falcização e os fenômenos celulares que desencadeiam as lesões tissulares. Assim, o genótipo que produzem uma menor concentração de Hb S ou uma elevada concentração de Hb F (hemoglobina esta que não interage com as moléculas de Hb S) dificultam a polimerização e falcização , reduzindo a gravidade e intensidade das manifestações clínicas (Tabela 1). Por esses motivos, o quadro clínico é mais grave na anemia falciforme (genótipo Hb SS) e na doença falciforme associado com a beta talassemia (genótipo Hb S β^0) sem níveis elevados de Hb F (ou seja Hb F < 10%), enquanto casos mais leves são aqueles com elevação de Hb F e pacientes com genótipo Hb S β^+ . Nestes últimos pacientes ocorre a produção de Hb A que, embora em menor quantidade do que a Hb S, é suficiente para inibir a formação de polímeros. A hemoglobinopatia SC (Hb SC) tem uma posição intermediária, porque a hemoglobina C (Hb C) é capaz de participar parcialmente da formação de polímeros de Hb S. A Tabela 2 expõe, dependendo do genótipo e doença falciforme, as diferenças no padrão eritrocitário e a quantidade de células falcizadas quando vistas à microscopia. (42)⁽³¹⁾

1.6.3- O Haplótipo da Doença

Em 1978, Kan e Dozy (43) descreveram a sequência de bases nitrogenadas do gene da globina heta normal (Hb A) e da globina beta S (Hb S). Em 1980, esses mesmos pesquisadores estudaram a evolução da Hb S por meio de técnicas de biologia molecular em vários doentes falcêmicos e concluíram que apesar da mutação da Hb S ser a mesma em todos eles, haviam diferenças entre as sequências de bases nitrogenadas ao longo do grupamento dos genes da globina beta, sem que as sequências diversificadas influenciassem na síntese da hemoglobina S. Esses estudos realizados por fracionamento das sequências de bases induzidos por enzimas extraídas geralmente de bactérias (endonucleases), permitem estabelecer que a Hb S originou em pelo menos três regiões da África: Senegal, Benin e Bantu. (44) Atualmente acredita-se que além dessas regiões, outras duas regiões, uma na África (Camarões) e outra na Ásia (Arábia e Índia) também sofreram o impacto da mutação da Hb S (Figura 9). Essa diferenciação antropológica antropológica identificada por técnicas de

biologia molecular entre pessoas doentes com Hb s é conhecida como haplótipos. Até o presente, são conhecidos os haplótipos Benin, Bantu, Senegal, Camarões, árabe indiano e Atípicos (Figura 10)(45). Os estudos antropológicos e hematológicos realizados com pacientes com anemia falciforme (Hb S) e submetidos às análises de seus próprios haplótipos, revelam que o haplótipo Benin e Bantu estão relacionados com maior grau de anemia quando comparados com os Senegal, Camarões e Árabe Indiano (tabela 4), provavelmente devido a persistência da Hb Fetal nesses três haplótipos. (46)⁽³¹⁾

Tabela 1- Alterações hematológicas nos diferentes genótipos de D.F.

Genótipos	Hb (g/dl) Média (variação)	Ht (%) Média (variação)	VCM	Hb S %	Hb F %	Hb A %
SS (SS e SF)*	7,0 (5-9)	22 (18-30)	N	90-100	2-10	Zero
S/β ⁰ Tal.	8,0 (7-10)	25 (20-25)	D	70-90	5-20	Zero
S/β ⁺ Tal. (SFA)	9,0 (8-11)	30 (25-35)	D	50-80	5-10	10-40
SD (SD)*	10 (8-12)	30 (25-35)	N	40-60	-	Hb D: 40-60
SS/Tal α (SFH)*	8,0 (6-10)	30 (25-30)	D	80-90	10-20	Hb H: 1 a 10%
SC (SC)*	11 (9-13)	30 (25-30)	N	40-60	-	Hb C: 40-60
S/PHHF (SF)*	12 (10-14)	35 (30-40)	N	60-80	15-30	Zero
AS(**) (AS)*	13 (12-16)	40 (38-50)	N	30-40	-	60-70

Fonte: Introdução – Doença Falciforme – Hemoglobinopatias [Internet]. [cited 2017 Aug 13]. Available from: <http://hemoglobinopatias.com.br/introducao-doenca-falciforme>

Notas:

(*) Principais frações de hemoglobinas identificadas por eletroforese alcalina

(**) O genótipo da Hb AS não é considerado doença das células falciformes. Foi incluído apenas para efeito de comparação. O portador de Hb AS é assintomático.

No Brasil, em 1992, Zago, Figueiredo e colaboradores fizeram o estudo brasileiro mostrando a distribuição de haplótipos ligados ao gene da Hb S, inicialmente restrito a Ribeirão preto, na região Sudeste e depois estendido a outras cidades brasileiras(47,48) Adicionado a este, outros estudos maiores estão resumidos na Tabela 4.(47–54) Embora haja certa diversidade regional, de modo geral, predomina o haplótipo Bantu, seguido do haplótipo Benin, sendo raro os exemplos de haplótipo Senegal.

Tabela 2- Alterações eritrocitárias nos diferentes genótipos de D.F.

Genótipos	Alterações eritrocitárias mais comuns
SS	Células falcizadas e em alvo. Hipocromia e policromazia. Eritroblastos. Corpos de Howell-Jolly. Reticulocitose (*). Corpos de Heinz (*)
S/β Tal. (**)	Células falcizadas, microcitose, dácricitos e células em alvo. Hipocromia e policromasia. Reticulocitose.
SD	Anisocitose, poiquilocitose, hipocromia. Poucas células falcizadas.
SS/Tal α	Anisocitose, microcitose, hipocromia e policromasia. Poucas células falcizadas
SCαααα	Anisocitose, poiquilocitose, células em alvo, cristais de Hb C, hipocromia. Poucas células falcizadas.
S/PHHF	Discreta anisocitose e anicromasia. Poucas células falcizadas.
AS(***)	Normocitose e normocromia

Fonte: Introdução – Doença Falciforme – Hemoglobinopatias [Internet]. [cited 2017 Aug 13]. Available from: <http://hemoglobinopatias.com.br/introducao-doenca-falciforme>

Notas:

(*) Visíveis quando coradas com azul de crezil brilhante a 1%

(**) inclui os genótipos S/β⁰ Tal. (ou SF) e S/β⁺ Tal. (ou SFA).

(***) O genótipo AS não é considerado como doença falciforme. Foi incluído apenas como efeito de comparação.

Tabela 3- Haplótipos da A.F. e seus efeitos na gravidade clínica e hematológica conforme nível de Hb F

Haplótipo de Hb	Hb total (g/dl)	Hb F (%)	Gravidade Clínica
Bantu	5,0 – 8,5	5 – 7	++++
Benin	7,0 – 8,5	5 - 7	+++
Senegal	8,0 – 9,0	8 - 10	++
Camarões	8,0 – 9,0	5 - 7	++
Árabe-Indiano	~ 9	15 - 20	+
Atípica	~ 8	5 - 7	Variável

Fonte: Introdução – Doença Falciforme – Hemoglobinopatias [Internet]. [cited 2017 Aug 13]. Available from: <http://hemoglobinopatias.com.br/introducao-doenca-falciforme>

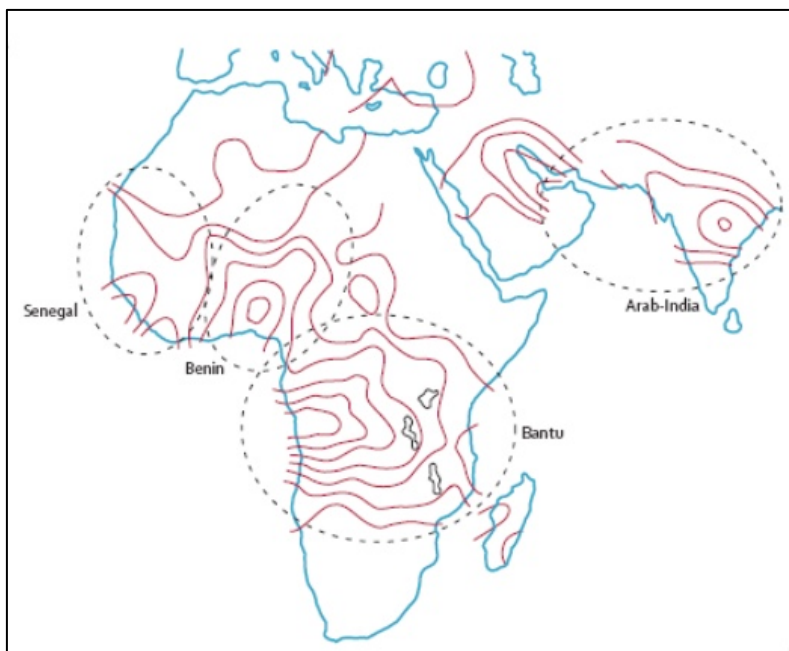


Figura 9 - Regiões de origem e abrangência dos três principais haplótipos β^S africanos e um asiático.

Fonte: Fonte: Stuart e Nagel, 2004

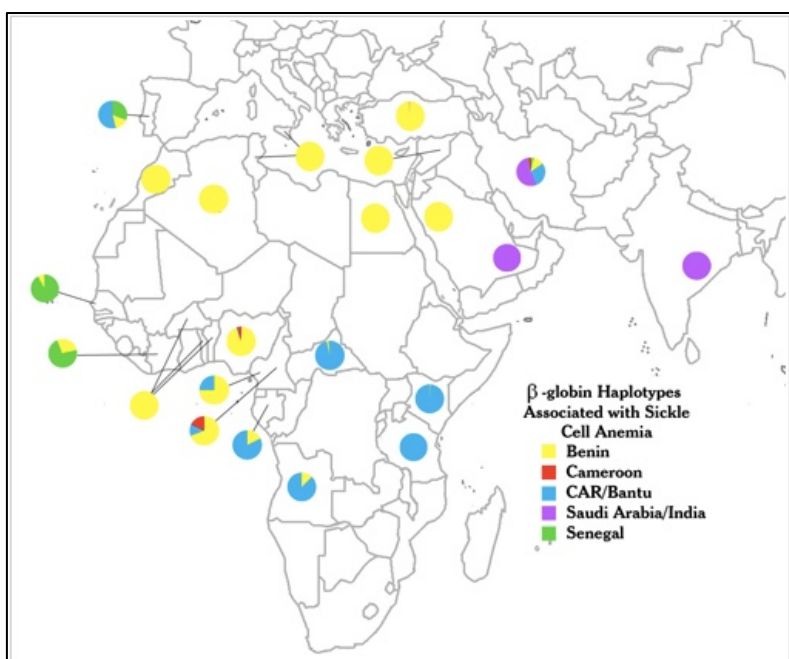


Figura 10 - Distribuição dos haplótipos β^S entre as nações com alta prevalência de anemia falciforme.

Fonte: Sickle-Cell Anemia: A Look at Global Haplotype Distribution [Internet]. [cited 2017 Aug 14]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/sickle-cell-anemia-a-look-at-global-8756219>

Nota da figura 10:

Cada cor representa um diferente haplótipo batizado com o nome do país onde foi primeiramente descoberto. Observa-se que os haplótipos não estão restritos as nações com os nomes de origem, sendo encontrados largamente distribuídos (exemplo: O haplótipo Benin está presente em várias nações, ou há múltiplos haplótipos em uma só nação)

CAR= Central African República.

Tabela 4- Alguns estudos(47–54) demonstrando a distribuição de haplótipos ligados ao gene da Hb S em pacientes brasileiros com doenças falciformes.

Localidade	Cromossomos (n)	Haplótipos (%)		
		Bantu	Benin	Senegal
Ribeirão Preto	66	73,0	25,5	1,5
Belém	60	66,7	30,0	3,3
Belém	260	66	21,8	10,9
Campinas e São Paulo	142	64,7	35,2	0
Porto Alegre	49	79,6	18,4	2,0
Salvador	160	50,6	48,7	0,7
Total	737	63,1	30,9	4,3

Fonte: Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2007 Sep [cited 2016 Jan 25];29(3):207–14. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

1.6.4 - Fatores Adquiridos

O nível socioeconômico e educacional ocupa uma posição central, pois determina variantes que influenciam diretamente a evolução clínica da doença: acesso à atenção médica, diagnóstico precoce, alimentação e nutrição de boa qualidade, acesso a saneamento básico e, portanto, água de boa qualidade e menor exposição a infecções, melhores condições de vida e de trabalho, além de tratamento rápido de complicações. ⁽³¹⁾

1.6.5- O Escore de Gravidade da Doença Falciforme

A anemia falciforme é caracterizada por um largo e heterogêneo curso clínico entre pessoas que tem a mesma mutação (Hb S), variando de pacientes que tem uma expectativa de vida normal com poucas complicações clínicas à outras com severas complicações como hipertensão pulmonar, Priapismo, AVC, síndrome torácica aguda e necrose vascular da cabeça do fêmur. (55)

A base molecular da formação da Hb S já é conhecida, mas somente a mutação (Hb A, Glu-6-Val, rs334) não é suficiente para explicar a heterogeneidade de fenótipos em pacientes falcêmicos. Outros fatores como níveis de Hb F, (31) , associação genotípica com α -talassemia(56), polimorfismo genético(56), uso de Hydroxyureia(56) assim como fatores adquiridos (relacionados ao nível socioeconômico)⁽³¹⁾ tem sido identificados como moduladores da AF.

Mesmo com o aprimoramento do conhecimento do genoma humano, o desenvolvimento de novas ferramentas de identificação de polimorfismos de nucleotídeos (SNPs) associado um o largo estudo dessas associações genômicas (GWAS) (57), ainda há um grande desafio em combinar todas essas variantes e estabelecer um possível preditor em potencial para estabelecer um critério de gravidade para pessoas com doença falciforme.

Muitos estudos foram feitos com o objetivo de estabelecer uma classificação no padrão de gravidade da DF tendo como bases de dados para esse calculo, parâmetros clínicos e laboratoriais que influenciam no risco relacionado a mortalidade dos pacientes com DF(58,58–63).

Sebastiani e colaboradores , do grupo da Boston University School of Public Health nos EUA(64) ,desenvolveram um modelo de predição de gravidade usando um modelo matemático de probabilidade conhecido como uma rede bayesiana. Essa abordagem representa de forma simples, as relações de causalidade das variáveis de um problema, que no caso em questão são os parâmetros clínicos e laboratoriais da pessoa com DF com o risco de morte em 5 anos (figura 11) . Os usuários desse sistema precisam somente inserir os valores das variáveis (Quadro 3) na calculadora (disponível no <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/projects>) e classificar os pacientes com DF de acordo com a faixa de escore estabelecida. Este modelo, que considera o risco de morte em 5 anos

como escore de gravidade da DF, estabelece a faixa de risco que varia na faixa de 0 (pouco grave) à 1 (muito grave).

Recentemente (2015), este escore foi aplicado em uma população de pacientes com DF do Rio de Janeiro(65) com o objetivo de testar a viabilidade do uso dessa ferramenta em grupo de indivíduos distintos à população original do estudo que foi derivada dos EUA. Como resultado, o cálculo do escore de gravidade nos pacientes do Rio mostrou ter alta sensibilidade e alto valor preditivo positivo. Cesar Purim, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, ano de 2017, aplicou esta ferramenta num total de 122 com DF atendidos na FHEMOAM. Do banco de dados da população de estudo de Purim, foram extraídos os dados de escore de gravidade somente de pacientes com AF deste estudo, obedecendo as regras de inclusão e exclusão estabelecidas, para análise estatística com outras variáveis deste trabalho.

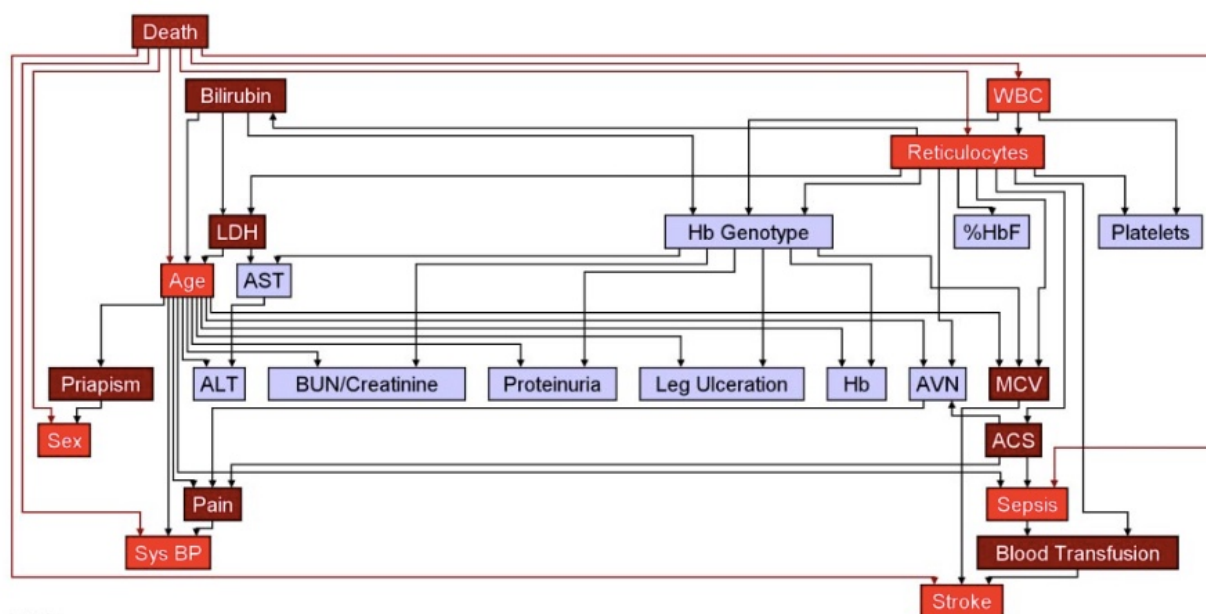


Figura 11 - A rede de associação entre morte, complicações clínicas e achados laboratoriais na doença falciforme.

Fonte:

Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2017 Aug 15];110(7):2727–35. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-04-084921>

1.7– O Heme na Imunidade Inata e Inflamação

O Heme é composto por um anel porfirínico no qual se acomoda em seu centro um átomo de ferro (Fe) ligado a quatro átomos de nitrogênio. A capacidade de quelação do Fe de levar a uma reversível mudança no seu estado de oxidação fornece ao heme uma catálise biológica versátil agindo em reações oxidativa, processo de transferência de elétrons e transporte de oxigênio molecular (O₂) para as células. O Heme está presente em diferentes formas, muitas delas na forma *a*, *b* e *c*. Heme *a* e *c* são importantes na fisiologia de transporte de elétrons e são encontrados no citocromo C oxidase e citocromo C redutase respectivamente. Heme *b* é o tipo mais comum em mamíferos sendo parte de várias proteínas incluindo a hemoglobina e mioglobina. (66)

Quadro 3 - Variáveis clínicas e laboratoriais usadas para o cálculo do escore de gravidade da DF

Características Laboratoriais	Características Clínicas
Alanina aminotransferase (ALT)	Idade
Aspartato aminotransferase (AST)	Sexo
Creatinina	Síndrome torácica aguda
Bilirrubina total (mg/dL)	Transfusão sanguínea
Lactato desidrogenase (LDH)	Crises de dor aguda
Volume corpuscular médio (MCV)	Priapismo
Contagem de reticulócitos	Acidente vascular cerebral (AVC)
Contagem total de leucócitos (WBC)	Necrose avascular óssea – cabeça do fêmur (AVN)
Hemoglobina	Úlcera em membros inferiores
Contagem de plaquetas	Sepse
Genótipo da DF	Pressão arterial sistólica
% de Hemoglobina fetal (Hb F)	

Nota do quadro 3: Alguns parâmetros não são rotina em determinados centros que prestam assistência a doentes falcêmicos. Durante o cálculo do escore de gravidade, mesmo na ausência de qualquer variável (clínica ou laboratorial) a calculadora permite ao pesquisador entrar com a opção “non available” para o determinado dado indisponível.

Deste modo, a calculadora corrige um valor de referência e o risco de morte de acordo com as outras variáveis que estão disponíveis. (65)

Apesar de sua importância fisiológica, o heme tem uma potente capacidade oxidativa em lipídeos e proteínas além de causar danos no DNA. Deste modo, torna-se uma molécula nociva uma vez liberado das hemoproteínas durante processo de hemólise ou dano tecidual. Deste modo, passaremos a considerar o heme livre aquele quando conjugado com sua molécula de globina, os quais formam a hemoglobina, molécula esta presente no eritrócito. (67)

A injeção de hemoglobina leva à permeabilidade vascular, migração leucocitária do ambiente intravascular para os tecidos além de aumentar a contagem de proteínas da fase aguda, marca da inflamação aguda(67) .A hemoglobina livre liberada por lise de eritrócitos ativa as células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1, E-seletina, P-seletina e fator de Von Willebrand e causa migração leucocitária(68)(69) .As moléculas de adesão possibilitam que os neutrófilos se fixem firmemente no endotélio e migrem para os tecidos. Assim, os leucócitos podem ser ativados e expressam moléculas de adesão complementares a aquelas expressadas pelo endotélio. Os neutrófilos induzidos pelo grupamento heme leva a liberação de NET's (extracelular traps) através de mecanismos dependentes da geração de ROS(70) .Além disso, o heme induz a produção da interleucina IL-8 pelas células endoteliais e pelos neutrófilos(71)(69).Apesar dos neutrófilos terem importantes funções controlando as infecções, essas células podem promover danos vasculares e tissulares pela geração de ROS, secretando proteases e liberando cromatina extracelular (NET's)(72) .Em consequência disso, a prolongada atividade dessas células é danosa para a homeostase tecidual. Neste contexto, a hemoglobina livre no plasma inibe a apoptose dos neutrófilos, aumentando sua longevidade e possibilitando o maior estímulo danoso destas células.(73)

Em estados de hemólise exacerbada, como no caso da DF, os macrófagos contribuem para a resposta inflamatória pelo aumento da secreção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. TNF, IL-6 e IL-18 que são citocinas que regulam a morte celular (necroptose), aumentam a permeabilidade vascular, recrutam células do sistema imune para o tecido inflamado e induz a produção de proteínas da fase aguda. Além disso, IL-1 β e TNF modifica limiar de temperatura hipotalâmica do corpo causando febre. A KC (Keratinocyte-derived chemokine) é uma quimiocina que atrai neutrófilos para o local da inflamação e o LTB₄

(leucotrieno B4) é o mediador lipídico que atua como uma molécula quimioatrativa e também ativa leucócitos. O heme ativa macrófagos induzindo a produção de TNF, KC, IL-1 β e LTB4.(74) Apesar das funções inflamatórias do KC e IL-1 β não terem sido investigadas durante a indução por componentes do heme, o TNF e o LTB4 foram descritas como mediadores inflamatórios essenciais durante eventos inflamatórios induzidos pelos componente do grupo heme. (66)

1.8 - Papel do Sistema Imune e a Resposta Inflamatória na Anemia Falciforme

O reconhecimento pelo sistema imune de componentes próprios e não-próprios do organismo conta com receptores moleculares específicos, bem conservados durante a evolução, denominados de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), presentes em células da imunidade inata (macrófagos e neutrófilos), bem como em células natural killers (NK) e células dendríticas (75)(76) .Esses receptores são essenciais para reconhecimento de padrões moleculares associado a patógenos (PAMPs), e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), um grupo de moléculas endógenas derivadas de danos celulares e da degradação da matriz extracelular. A ativação dos PRRs pelos PAMPs ou DAMPs inicia uma cascata de sinalização que leva a produção de interferons (interferons alfa e interferons beta) e citocinas proinflamatórias. Os PRRs incluem os receptores tipo Toll (TLRs), receptores de ligação ao nucleotídeo contendo domínio com sequência rica em leucina (receptores tipo NOD-NLRs), receptores de Lecitina tipo C e receptores tipo RIG-I (RLRs)(66)(77)(78) .(Quadro 4)

Na família dos receptores tipo Toll (TLRs), os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 estão expressos na membrana celular, enquanto que os receptores TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e, recentemente descoberto, TLR13(79) são expressos nos compartimentos do endossoma intracelular.

Os receptores de Lecitina tipo C também são expressos na membrana celular, ao passo que os receptores tipo RLRs estão presentes no citoplasma(78).

Os NLRs, presentes no citoplasma celular, são sensores citoplasmáticos que se oligomerizam para formar uma plataforma – **O INFLAMOSSOMA** – que consiste em um complexo proteico que controla a produção de citocinas proinflamatórias como, IL-1 β e IL-18(80).

A figura 12 mostra as quatro principais classes de PRR's, suas localizações na célula, seus mais importantes ligantes com destaque para a formação do inflamassoma (seta cheia) e sua atuação no sistema imune inato(81).

O conceito de que os efeitos citotóxicos e inflamatórios do heme livre eram exclusivamente mediados capacidade oxidativa do Fe associada com a propriedade anfipática do anel de porfirina não é mais aceito. Também, O heme livre é um clássico DAMP, que leva a ativação do inflamassoma através do TLR4.(Figura 13) (66)(82)(83)

O achado de que a hemólise e os componentes da hemoglobina livre no plasma (em destaque para o heme) desempenham um importante papel na inflamação e na ativação do inflamassoma abre caminho para o melhor entendimento do comportamento clínico da doença nos pacientes falcêmicos.(83)

Quadro 4 - As quatro maiores classes de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR's) e seus mais importantes ligantes.

PRR's	Localização	Ligantes	Origem dos ligantes
TLR Toll-like receptors	Membrana plasmática e endossoma	Lipoproteínas, DNA, RNA, endotoxina, sinais de perigos endógenos, dipeptídeo muramil	Bactérias, vírus, parasitas e componentes próprios do organismo
NLR NOD-like receptors	Citoplasma	Sinais de perigo endógenos,	Componentes próprios do organismo, bactérias
CLR C-type lectin receptors	Membrana plasmática	Beta-glucanos	fungos
RLR Retinoicoacid-inducible gene-1-like receptors	Citoplasma	RNA de dupla cadeia	RNA viral

Fonte: adaptada da tabela 1 da referência (78)

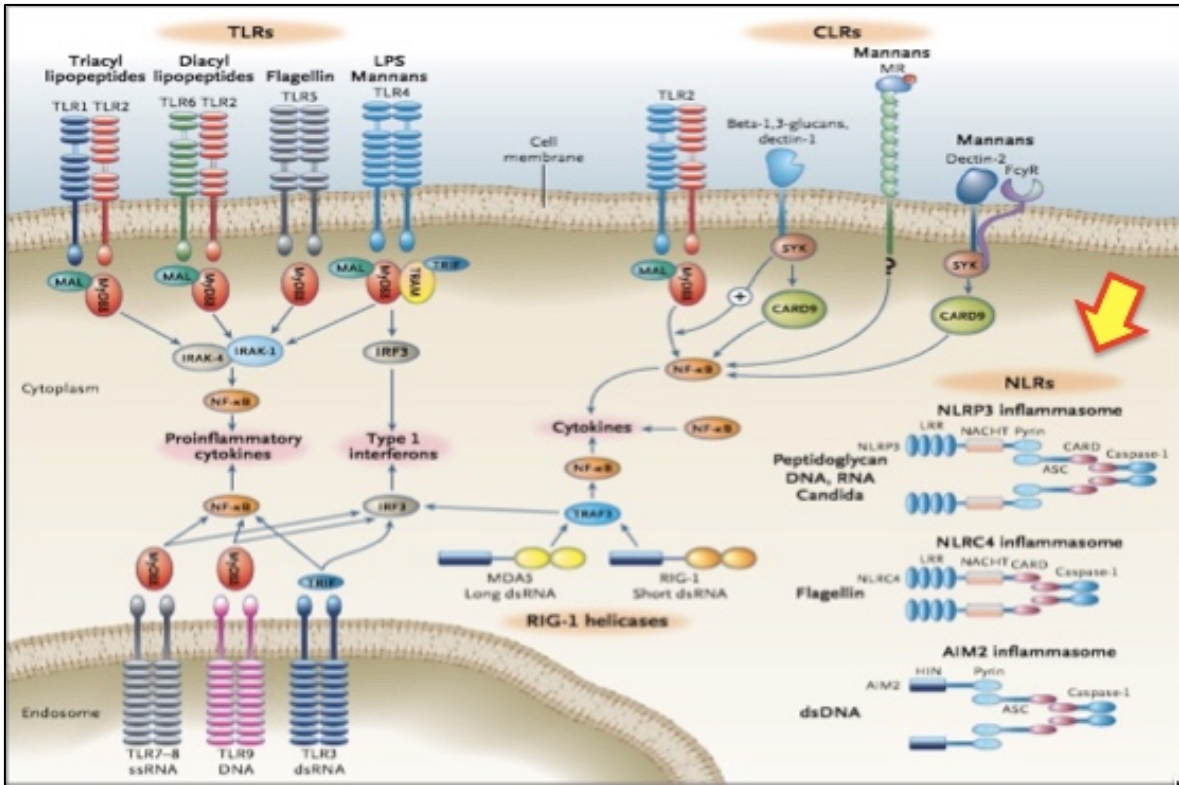


Figura 12 - As quatro principais classes de PRR's, sua localização na célula, seus ligantes e sua ação no sistema imune inato.

Fonte: Referência (81)

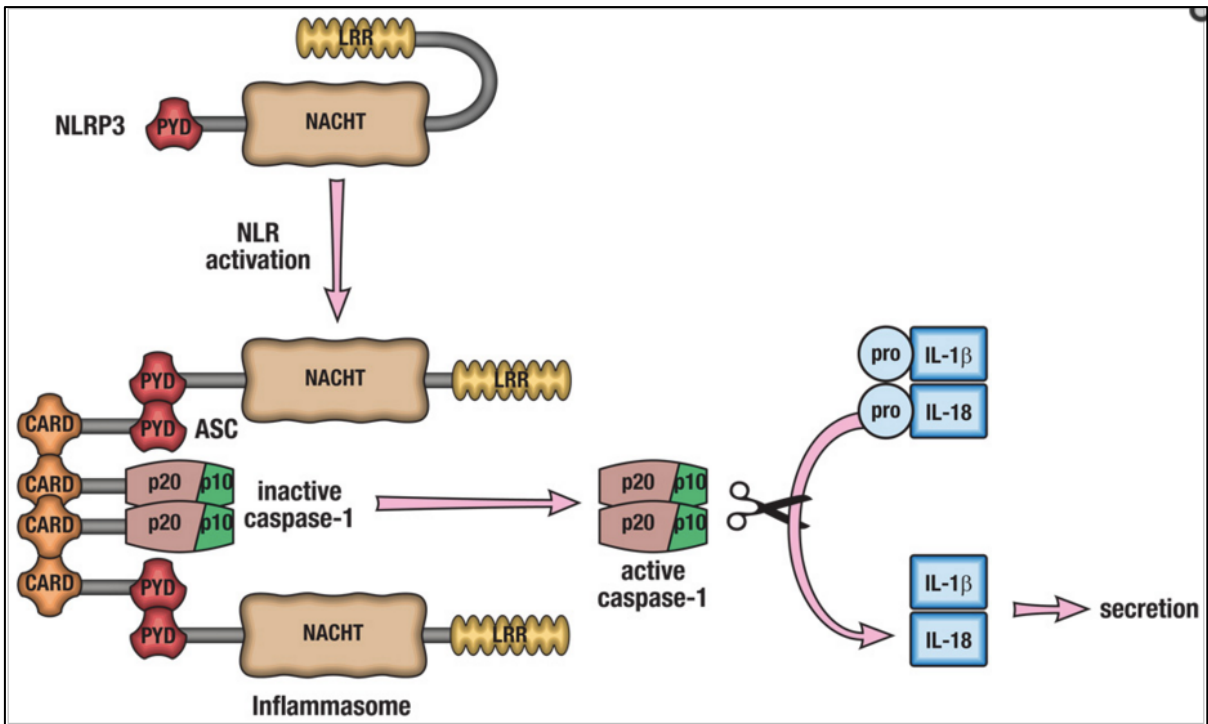


Figura 13 - Ativação do inflamassoma.

Fonte: Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD (2011)

Nota da figura 13:

Os inúmeros inflamassomas são ativados por um largo espectro de DAMPs e PAMPs. Como exemplo temos a ativação do NLRP3. Uma vez ativado a proteína NLR sofre uma mudança conformacional, permitindo que se ligue a proteína adaptadora ASC via domínio de ligação de pirina. ASC age como uma proteína adaptadora e liga-se a procaspase-1 através do domínio de recrutamento de caspase (CARD). Esta plataforma proporciona a autoclivagem da caspase-1 por clivagem proteolítica. As caspase 1 ativa (p20/p10) desta forma cliva as pré-formas de IL-1 β e IL-18, seguindo assim sua atividade biológica.

1.9- Os Inflamassomas NLRP3 e NLRP1 na Anemia Falciforme

O inflamassoma é um complexo multiproteico composto pela proteína NLR, adaptador ASC e a enzima caspase. A ativação do NLR por um DAMP ou PAMP leva ao recrutamento da proteína adaptadora ASC e da pro-caspase com a formação desse complexo pentamérico ou heptamérico - (Figura 13).(84)

As caspases são enzimas da família cisteína aspartato proteases (Cysteiny-ASPartate proteASES) envolvidas no processo de apoptose, necrose, regulação celular e inflamação. De forma geral, a família das caspases pode ser dividida em apoptóticas, como as caspases -3, -7 e -8 e inflamatórias, como as caspases -1 e -11. Elas existem na forma inativa no citosol, como zimogênios, e são ativadas pela clivagem por outras caspases. (85)

A atividade mais conhecida e de interesse desse projeto por envolver a ativação do inflamassoma NLRP3, envolve o recrutamento da pro-caspase-1, tanto por ligação à ASC quanto por ligação ao NLR diretamente, causa uma catálise de aproximação, gerando subunidades catalíticas da caspase 1, p20 e P10. (86)

A função mais descrita para a caspase 1 ativada é a clivagem da pro-IL-1 β e pro-IL-18, de forma que a via de sinalização dos NLRs pelo inflamassoma culmina com a secreção de citocinas IL-1 β e IL-18 ativas. Para essa via ocorrer, as moléculas pro-IL-1 β e pro-IL-18 precisam estar anteriormente presentes no citoplasma celular, e a produção dessas pró-citocinas é dependente de um primeiro sinal via NF- κ B, o qual pode ser induzido por sinalização via TLRs ou TNF. Este primeiro sinal é também descrito como promotor da expressão de outros componentes do inflamassoma. (84)

As citocinas da família IL-1 (IL-1 β e IL-18) tem ação pleiotrópica com efeitos fisiológicos em vários tipos celulares (queratinócito, sinóvia, fibroblastos, macrófagos e células da glia), na regulação do apetite, sono, temperatura corporal, porém participam na

fisiopatologia da artrite reumatoide, dor neuropática, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e doenças vasculares. (84)

O papel para os inflamassomas nas doenças acima descritas e em algumas doenças autoimunes é provável, considerando o largo espectro de sinais endógenos de perigo (DAMPs) que ativam os NLRs e o papel que as citocinas IL-1 β e IL-18 podem exercer na formação da imunidade adaptativa que, em geral exercem um efeito amplificador na respostas dos linfócitos B e T e estas citocinas podem se prestar como uma crucial ligação de entendimento da ativação dos NLRs dentro da imunidade adaptativa. (87)

O inflamassoma NLRP3 (NLR-related protein 3 inflammasome) também chamado CIAS1, PYPAF1, Cryopirina, CLR1.1 ou simplesmente NALP3 é um dos mais caracterizados membros da família dos NLRs.(88) A expressão do NLRP3 é detectada principalmente no citosol de granulócitos, células dendríticas, linfócitos T e B, células epiteliais e osteoblastos.(89) Pode ser ativados em resposta a uma vasta faixa de estímulos tanto endógenos como exógenos, como ATP, cristais de colesterol e alumínio e acídose extracelular.(84) O mecanismo da ativação do NLRP3 apoiados por muitos estudos incluem o efluxo de potássio para fora da célula, a geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mROS), a translocação do NLRP3 para a mitocôndria, a liberação de DNA mitocondrial ou cardiolipina, e a liberação de catepsina dentro do citosol após a desestabilização lisossomal. (75)

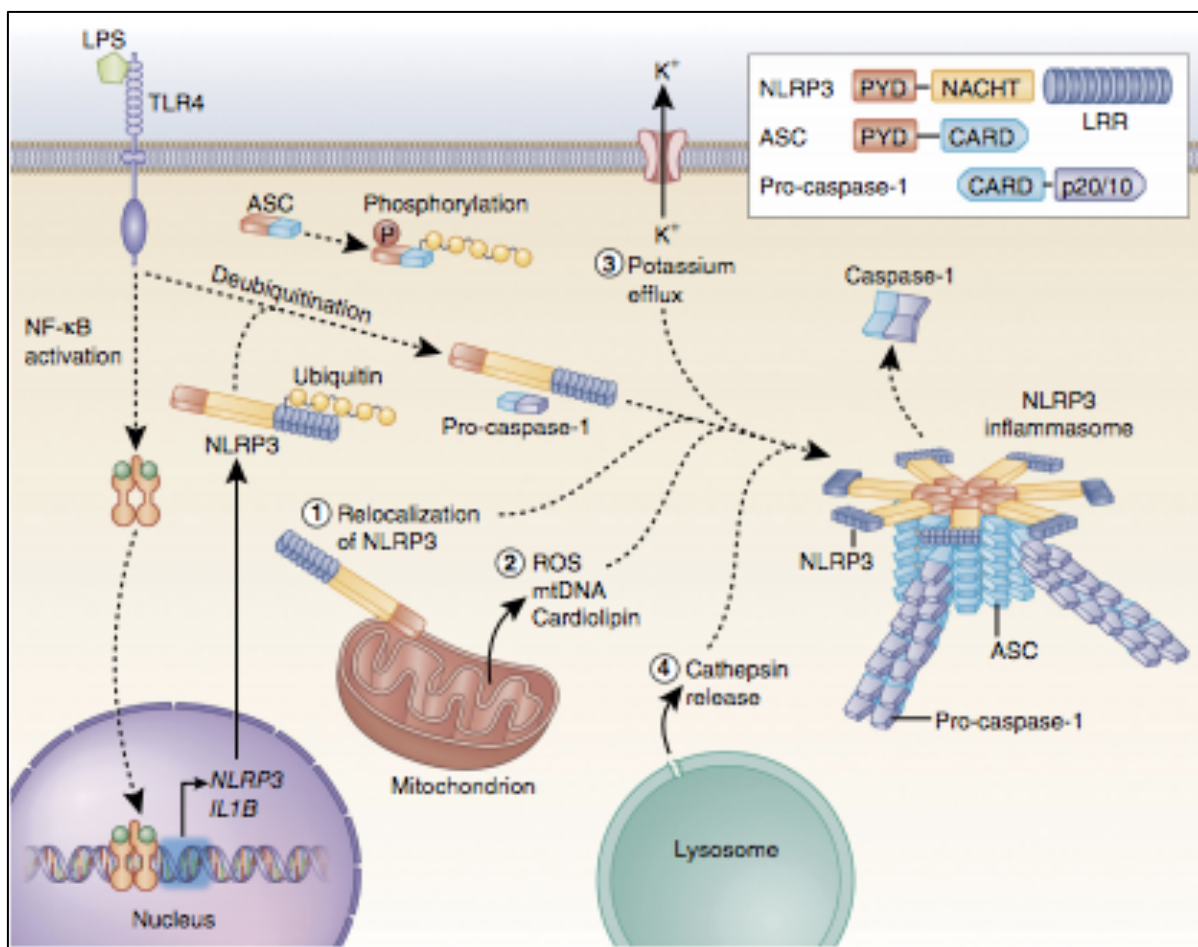


Figura 14 - Mecanismos de ativação do NALP3. A ativação do NLRP3 via TLR4 envolve o a ativação do NF- κ B. Este induz elevada expressão do NLRP3.
Fonte: Sh Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y (2015)

No contexto da ativação do NLRP3 na anemia falciforme, o aumento do heme livre no plasma tem recentemente mostrado ativar este inflamassoma via TLR4. Essa via é bem conhecida por aumentar a expressão do NLRP3 através da sinalização por NF- κ B – (Figura 14).(80)

Estudos sugerem que a ativação das células endoteliais devido ao heme livre no plasma é ao menos em mediado por sinalização via TLR4. Essa via de ativação em células endoteliais leva a ativação do NF- κ B, expressão das moléculas de adesão e a degranulação de corpúsculos de Weibel-Palade, que contem VWF e P-seletinas, moléculas envolvidas na vasculopatia na doença falciforme. (66) (90)

Chen e colaboradores mostram que, somando a ativação do NLRP3 via TLR4, o heme livre no plasma promove a liberação de NETs ^(nota 4) devido ao aumento da formação de ROS intracelular. NETs são fibras compostas por cromatina (DNA e histonas) compostas de

peptídeos antimicrobianos. No contexto da DF, a formação de NETs contribui em aumentar a coagulação intravascular no decorrer do processo inflamatório. Assim, esse efeito poderia contribuir para os fenômenos de vaso-oclusão e síndrome torácica aguda no curso da DF.(70)(83)(66)

Deste modo, os efeitos biológicos inflamatórios exercidos pelas citocinas IL-1 β , IL-18, somado aos achados recentes de liberação de NETs por neutrófilos, ambos decorrentes da ativação do NLRP3 via a sensibilização do TLR4 pelo heme livre no plasma, mostra a importância do entendimento deste mecanismo inflamatório.(Figura 15) (70)

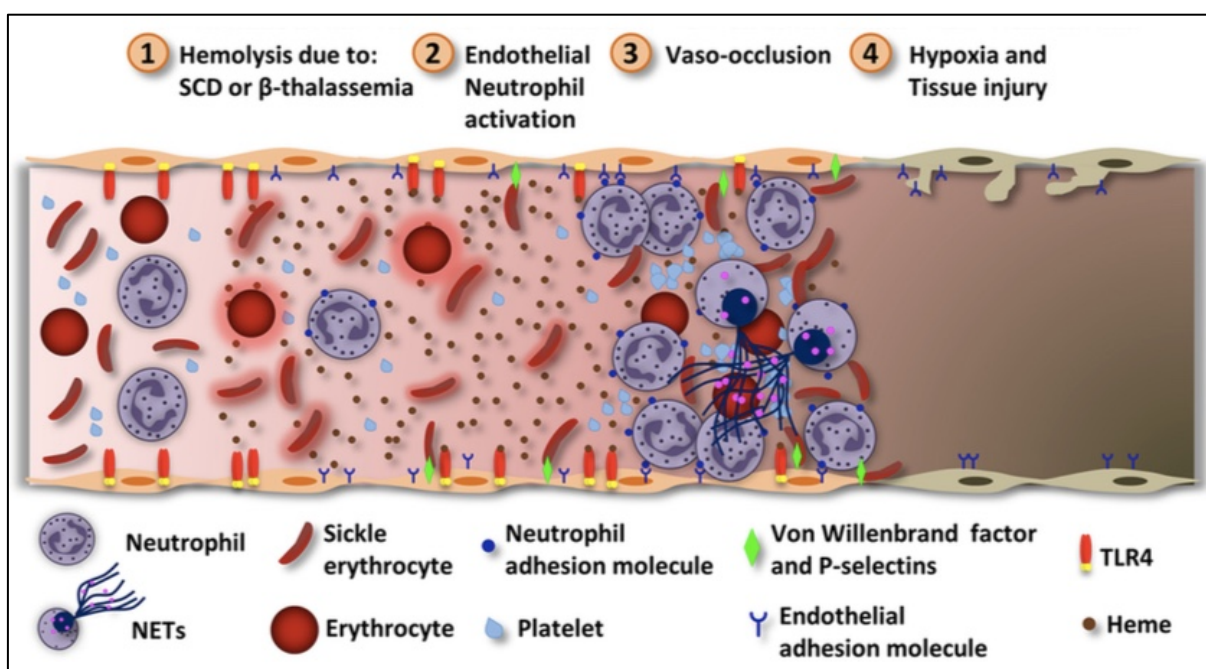


Figura 15 - A cascata de efeitos deletérios da presença de heme livre no espaço intravascular. Fonte:

Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Mar 13];5:115. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4035012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

O inflamassoma NLRP1 (também chamada de NALP1) foi o primeiro inflamassoma a ser identificado (91) e após a sua descoberta, outras proteínas com homologia semelhante ao NLRP1 foram também encontradas e categorizadas por formar similares complexos intracelulares (por exemplo: NLRP3, NLRP6, NLRP7 NLRP12 e NLRC4). O NLRP1 recruta a proteína adaptadora ASC, tal como a caspase 1 e a caspase 5, para formar o complexo inflamassoma, assim ativando o IL-1 β . (Figura16) O exato papel da caspase 5 é ainda

desconhecido (92). O NLRP1 Está abundantemente expresso em linfócitos (particularmente em linfócitos tipo T), células epiteliais do trato respiratório e células de Langerhans. (91,93). Apesar de estudos iniciais mostrarem que o inflamassoma NLRP1 poderia ser formado espontaneamente em células lisadas, recentes estudos descrevem pelo menos dois ligantes naturais para o NLRP1: o primeiro, o dipeptídeo muramil (um fragmento de peptídeo glicano oriundo tanto de bactérias Gram negativas como Gram positivas) (94) e o segundo e o mais bem caracterizado ativador do NLRP1 que é a toxina letal do *Bacillus anthracis*; Esta toxina ativa a caspase-1 e induz uma rápida morte celular via NLRP1. (95)

No âmbito da Anemia falciforme, uma doença inflamatória crônica, o conhecimento dos mecanismos de ativação e regulação dos inflamassomas tem sua relevância, uma vez que são plataformas moleculares para ativação de caspases pro-inflamatórias. Essas caspases clivam seus dois conhecidos substratos: as pro-inflamatórias citocinas IL-1 β e IL-18. A secreção de IL-1 β pelo inflamassoma NLRP1 também é dependente do efluxo de K⁺ e da liberação da proteína lisossomal catepsina B, de maneira análoga ao que acontece na ativação do inflamassoma NLRP3.(92) Todo esse processo de ativação de citocinas provoca uma potente resposta inflamatória. (96)

Deste modo, o entendimento do mecanismo de ativação e regulação tanto do inflamassoma NLRP1 quanto do inflamassoma NLRP3 merece atenção, uma vez que tem como foco sua resposta imune com a liberação das interleucinas IL-1 β e IL-18, cujo papel na fisiopatologia da anemia falciforme contribui para a variedade da apresentação clínica da doença. (96)

1.10- O Polimorfismo do Gene da Região Codificadora do NLRP3

O gene que codifica a proteína NLRP3 (que contem 1016 aminoácidos transcritos a partir do gene *NLRP3*) está localizado no cromossoma humano 1q44 e consiste de 9 exons.(89) Alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados com a ativação construtiva do inflamassoma NLRP3 à produção excessiva de IL-1 β , induzem uma família de doenças auto-inflamatórias graves, denominadas Síndromes Periódicas Associadas à Criopirina (CAPS).(97) Vários estudos tem revelado a associação do SNP Q705k (rs35829419), onde ocorre a troca de uma base C por uma base A e com isso a substituição do aminoácido glicina por uma lisina no gene NLRP3 com várias doenças inflamatórias incluindo doença celíaca, diabetes tipo 1 dentre outras. Esta mutação resulta em um ganho de função no gene NLRP3

levando uma proteína NLRP3 constitutivamente ativada, resultando em elevados níveis de produção de IL-1 β .(98)

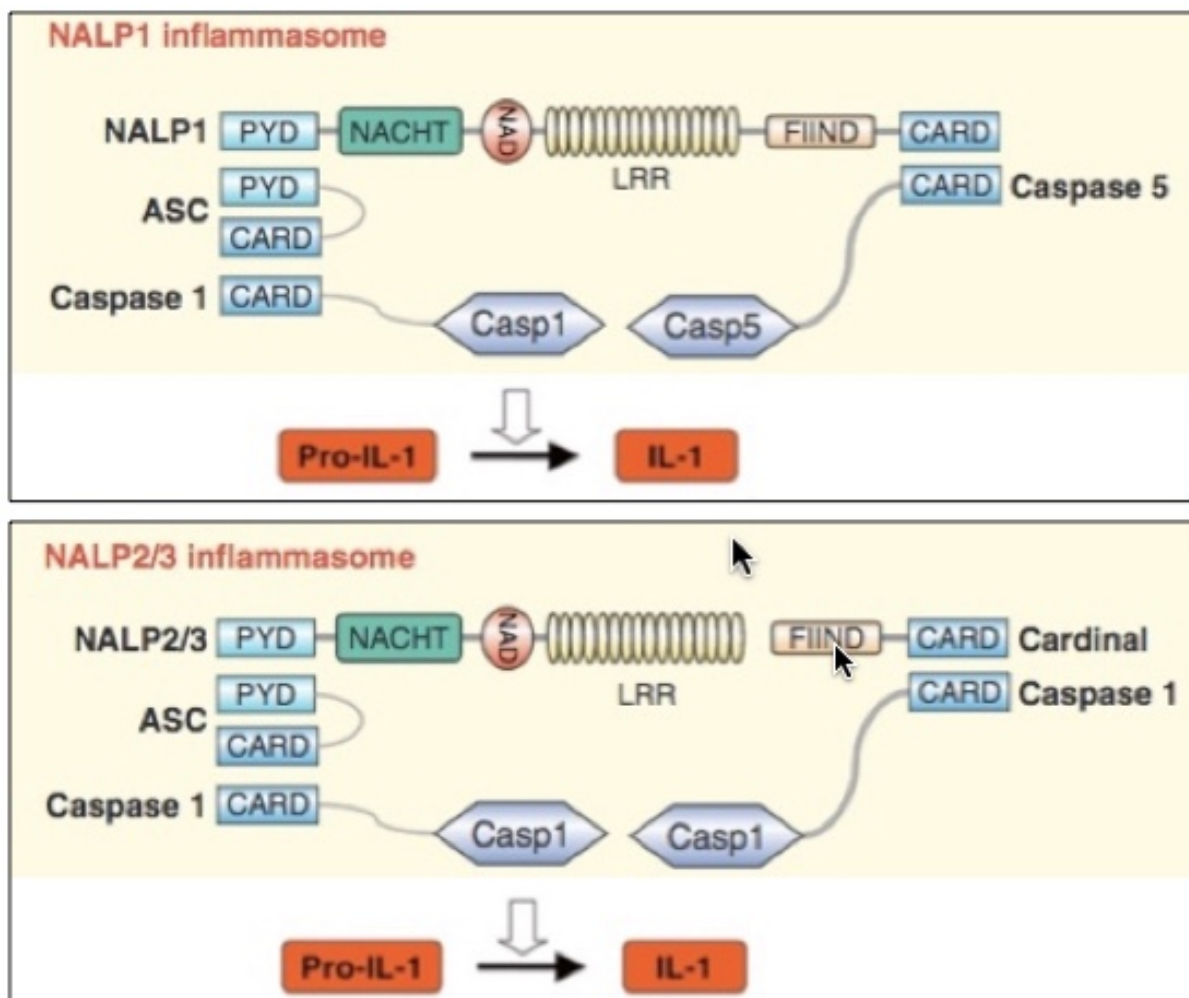


Figura 16 - Os complexos inflamassomas NLRP1 e NLRP3

Ambos NLRP1 e NLRP3 estão associados por interações hemotópicas entre domínios CARD, ASC e PYD. Enquanto que o NLRP3 requer um secundário adaptador de domínio CARD para clivagem da pro-IL-1, isso não é necessário no NLRP1 que possui um domínio FIIND e CARD ligado ao centro da proteína NLRP1.

Fonte: figura adaptada das referências (99) –figura 2- e (96) –figura1-

Também estão descritas várias doenças associadas a um SNP em íntrons, regiões intergênicas do genoma que não são traduzidas, relacionadas com a doença de Cronh, artrite reumatoide e diabetes tipo II. O SNP rs10754558 (C/G) na região não traduzida 3' do gene NLRP3 (3'UTR) tem sido reportado afetar a estabilidade do mRNA, uma vez que essa região é o sítio de ligação da poliadenização de microRNAs que regulam negativamente a tradução e outras proteínas que ajudam na estabilidade e na tradução do mRNA. Vários estudos

mostraram que o SNP rs10754558 (C/G) no 3'UTR do gene NLRP3 está associado com múltiplas doenças, principalmente com doenças inflamatórias. Hitomi e colaboradores mostraram a associação desse SNP com alta expressão do mRNA de NLRP3, o qual se mostrou envolvido na anafilaxia induzida por alimentos. Pontilho e colaboradores mostraram que o SNP 3'UTR no gene NLRP3 está associado a suscetibilidade a infecção pelo HIV-1.(100)

Na doença falciforme, a hemoglobina livre no plasma se comporta como um DAMP ativando o inflamassoma NLRP3. A abundância do polimorfismo do NLRP3 Q705K na população geral (5 a 11%) e a evidência de que o SNP na região não traduzida 3' do gene NLRP3 (3'UTR) pode provocar desordens imunes levando a um pior ou melhor prognósticos de doenças. Desta forma, faz sua investigação na doença falciforme altamente relevante. (101)

1.11- O Polimorfismo do Gene da Região Codificadora do NLRP1

O gene que codifica a proteína NLRP1 está localizado no cromossoma humano 17p13.2 e consiste de 18 exons. A clara conexão entre autoimunidade e os inflamassomas está bem representada no polimorfismo do gene que codifica o NLRP1: SNP's na região codificadora do NLRP1 tem sido associados a vitiligo generalizado, vitiligo associado à doença de Addison, à diabetes tipo I, à lúpus eritematoso sistêmico, à doença de Kawasaki, à doença celíaca, à artrite reumatoide, à esclerose sistêmica e à doenças autoimunes da tireóide. (102). Entretanto, os mecanismos pelos quais os SNP's do NLRP1 influencia autoimunidade permanecem ainda obscuros; entretanto, recentes estudos () encontraram que a autoimunidade associada aos SNP's do NLRP1 podem levar ao maior processamento de IL-1 β em resposta a estímulos inflamatórios.(103)

1.12- Os Polimorfismos dos Genes das Regiões Codificadoras das Citocinas IL-1 β E IL-18

Um dos mais importantes mediadores de inflamação provem da família das interleucina 1 (IL-1). As proteínas da família das IL-1 são citocinas que ampliam a cascata inflamatória por ativar células T (Th1 e Th2), regulando a manifestação de moléculas de adesão e induzindo a produção de outras citocinas próinflamatórias e proteínas associadas.(104) No *cluster* do gene da IL-1, no braço longo do cromossomo 2 (2q12-q13) há três *locus* que codificam três genes relacionados: IL-1 α (codificada pelo gene IL1A), IL-1 β (codificada pelo gene IL1B) e IL-1Ra (codificado pelo gene IL-1RN). A IL-18 faz parte da família da IL-1, no entanto o locus

genético da produção desta proteína está localizado no cromossomo 11 (11q22.2-q22.3).(105) As citocinas (IL-1 α , IL-1 β e IL-18) desta família são produzidas por células do sistema imune adquirido (linfócitos) e também por células do sistema imune inato (macrófagos, mastócitos e monócitos) no local da inflamação.(106) Além de compartilhar a homologia estrutural de suas moléculas e das células sanguíneas em que são produzidas, a IL-1 β e IL-18 também compartilham o processamento dos seus precursores pela enzima caspase 1, produto final após a formação da plataforma do inflamassoma NLRP3.(107)

O perfil genético tem uma importante influência na função e produção das citocinas, o qual podem ser atribuídas a uma variabilidade genética na totalidade do gene, incluindo a região codificadora, associada com a estrutura da citocina e das regiões regulatórias, tal como as regiões promotoras que influenciam na transcrição genética e da região não traduzida 3', o qual tem uma influência pós-transcricional na produção da citocina. Muitos trabalhos têm focado no estudo na variabilidade genética na região promotora dos genes das citocinas, particularmente na identificação de SNPs, o qual podem afetar a expressão genética como um todo, a secreção de citocinas, tanto in vivo como in vitro, estar envolvido na suscetibilidade de doenças imunoinflamatórias e infecciosas. (108)(109)(110)

Em um estudo de Pontillo e colaboradores (2012) envolvendo pacientes infectados por *Plasmodium vivax* sintomáticos na Região Amazônica, foi realizada a genotipagem de 10 polimorfismos associados aos genes pertencentes ao complexo inflamassoma, dentre eles o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs1143634 no gene da IL-1 β , no qual notou-se que a presença deste polimorfismo que estava associado a diminuição da carga parasitária.(111) Estudos associaram os polimorfismos do gene da IL-1 β com o aumento de risco de desenvolver gastrite, úlcera péptica, câncer e câncer cervical.(112)(113) Há indícios de que a IL-1 β está envolvida também com doenças neurodegenerativas, tanto agudas como crônicas, tais como isquemia, convulsões, esclerose múltipla, além de doença de Alzheimer(114)

Com o objetivo de explorar se polimorfismos no gene da IL-18 tem alguma influência na apresentação clínica de paciente com hepatite B, Karra e colaboradores (2015) demonstraram que dependendo da região promotora em que ocorre o SNP há efeito protetor ou não do organismo a infecção viral.(115) Trabalhos semelhantes sugerem a progressão do câncer oral e suscetibilidade de mal de Alzheimer frente a polimorfismo da IL-18.(116)(106)(105)

Em inúmeros estudos envolvendo polimorfismos no gene da citocina IL-1 β e IL-18 e seu impacto nas mais variadas doenças humanas, observa-se também a importância do mesmo no percurso clínico da anemia falciforme.

2- JUSTIFICATIVA

Dado a importante atuação que o sistema imune pode exercer na variabilidade de apresentação clínica dos pacientes falcêmicos, a maior compreensão da atuação destes mecanismos é essencial. Considerando a grande incidência da anemia falciforme no Brasil, avanços no entendimento de fatores moduladores da gravidade e da apresentação clínica que a doença apresenta há grande impacto em políticas públicas de atendimento aos pacientes via Sistema único de Saúde (SUS).

Com o emprego de técnicas de biologia molecular, a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em inflamassomas e em citocinas vem somar ao conhecimento já adquirido da apresentação clínica, estabelecendo sua correlação com o prognóstico. A abundância do polimorfismo do NLRP3 Q705K na população geral (5 a 11%) e a evidência de que o SNP na região não traduzida 3' do gene NLRP3 (3'UTR) pode provocar distúrbios imunes levando a um pior ou melhor prognósticos já foram estudadas em diversas outras doenças inflamatórias. O mesmo ocorre com os SNP's do NLRP1 que está associado a doenças como vitiligo, diabetes tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Addison, esclerose múltipla e artrite reumatoide.

Na anemia falciforme, uma doença inflamatória crônica, o heme livre no plasma se comporta como um DAMP ativando o inflamassoma NLRP3 resultando na liberação de citocinas IL-1 β e IL-18. Não há estudos sobre o impacto do polimorfismo dos inflamassomas NLRP3 e NLRP1 na anemia falciforme e poucos artigos ligam as associações entre os polimorfismos dos genes das IL-1 β e IL-18 e a apresentação clínica da doença(117). Deste modo, o conhecimento deste mecanismo de atuação na doença permitirá o manejo mais adequado e individualizado do paciente.

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Caracterizar os polimorfismos dos genes dos receptores dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e das interleucinas IL-1 β e IL-18 e suas relações com o escore de gravidade em portadores de anemia falciforme.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de polimorfismo dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 em pacientes portadores de anemia falciforme;
- Determinar a frequência dos polimorfismos dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 em pacientes portadores de anemia falciforme;
- Avaliar a influência do polimorfismo dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e do polimorfismo dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 na apresentação clínica da doença nos pacientes portadores de anemia falciforme

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo do tipo transversal que tem como objetivo analisar a frequência dos polimorfismos no gene do receptor dos inflamassoma NLRP1 e NLRP3 e dos polimorfismos dos genes da IL-1 β e IL-18 em pacientes com anemia falciforme (HbSS) e estabelecer a associação dessas modificações genéticas com dados clínicos e laboratoriais e o escore de gravidade dos pacientes do estudo.

4.2 – Tamanho amostral

O tamanho amostral da pesquisa foi realizado por conveniência, uma vez que não há estudos epidemiológicos publicados em nossa região caracterizando a população de interesse.

4.3 - População do Estudo

O HEMOAM a única instituição pública responsável pelo atendimento de pacientes com doença falciforme no Estado do Amazonas. Este atendimento é realizado através de consultas ambulatoriais regulares e de internações no setor de emergência para o tratamento de crises e outras complicações inerentes à doença. Os pacientes em estado estacionário com o diagnóstico já estabelecido de anemia falciforme (HbSS) são acompanhados por meio de consultas pré-agendadas nos ambulatórios nos turnos da manhã e da tarde.

Foi estudado uma coorte de 21 pacientes em estado estacionário da anemia falciforme (HbSS) desta instituição no período de maio a julho de 2017. A figura 17 sumariza a estratificação deste grupo de estudo. Os pacientes em estado estacionário de anemia falciforme (HbSS) foram abordados a participar do estudo quando em sua consulta ambulatorial pré-agendada. A coleta de dados e amostra biológica dos indivíduos do grupo controle foi realizada após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM, onde

foram abordados após passarem pelas triagens hematológica e clínica (entrevista) e quando estavam na sala de doação.

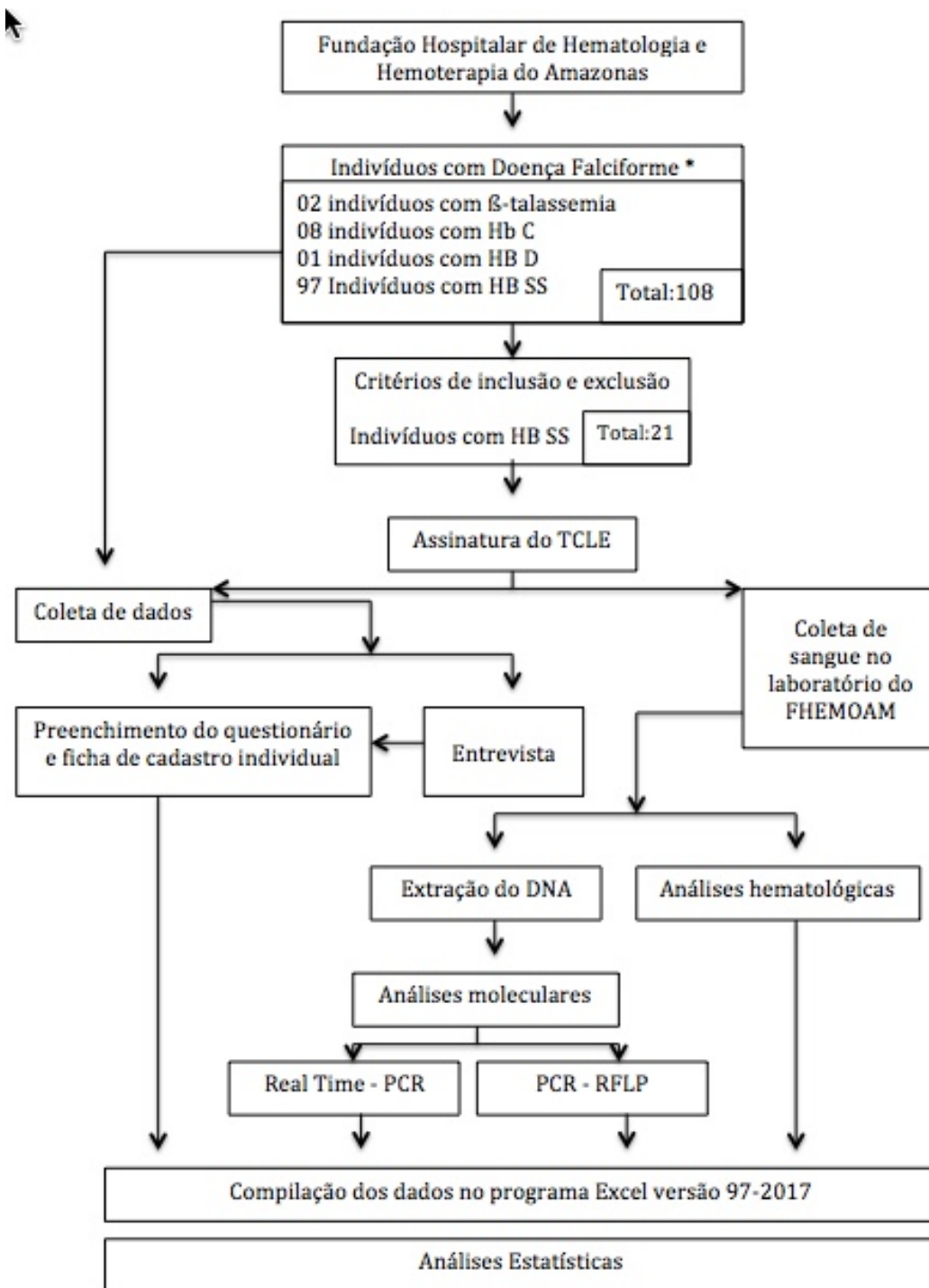


Figura 17 – Fluxograma do desenho do estudo; * Banco dados de Purim Cesar (2017).⁽¹¹⁸⁾

4.4 – Critérios de Inclusão e Exclusão

Para os indivíduos com anemia falciforme (HbSS), Os critérios de inclusão adotados foram: Indivíduos de ambos os sexos, atendidos no ambulatório da FHMOAM, com idade entre 18 e 65 anos, com genótipo confirmado de homocigoto para a presença de hemoglobina S (HbSS), informação esta obtida no prontuário do paciente. Como critérios de exclusão foram utilizados os seguintes parâmetros: Mulheres grávidas e/ou indivíduos com outras doenças infecciosas ou hematológicas. A exclusão da faixa etária de menores de 18 anos deu-se ao fato de que toda pesquisa a ser realizada com essa faixa etária anos necessita de consentimento por escrito de seu responsável, segundo o art. 3º das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos§ (Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde)(119). Como esse projeto faz parte de um projeto maior intitulado “*Potenciais Biomarcadores celulares e solúveis associados a diferentes haplótipos e fenótipos de anemia falciforme*”, este não inclui o estudo desta faixa etária na pesquisa.

Para indivíduos do grupo controle, foram incluídos aqueles que passaram pelos três protocolos de triagem presente no FHMOAM e após os exames sorológicos serem avaliados:

- Triagem hematológica

A Triagem Hematológica inclui, normalmente, a realização de um teste denominado hematócrito para se determinar se o doador tem anemia, a aferição da pressão arterial e verificação do peso e da altura do potencial doador voluntário de sangue.

- Triagem clínica – Entrevista

A entrevista visa determinar se o indivíduo é saudável, não portador de doença que o incapacite permanente ou temporariamente à doação, não esteja usando drogas, medicamentos ou vacinas, não tenha se submetido a procedimentos cirúrgicos recentemente.

- Triagem laboratorial

Após a coleta, a bolsa contendo o sangue do doador fica armazenada até a sua liberação pelo Laboratório de Sorologia. Testes são realizados para a classificação sanguínea e a detecção de doenças transmissíveis, os quais são feitos através de exames laboratoriais de alta sensibilidade. Os testes obrigatórios (segundo a Anvisa – RDC 57 de 16 de Dezembro de

2010 e portaria 1.353 de 13 de junho de 2011) são: HIV, HTLV I/II, Hepatite B, Hepatite C, Doença de Chagas e Sífilis.

4.5- Aspectos Éticos da Pesquisa

Esse projeto faz parte de um projeto maior intitulado “*Potenciais Biomarcadores celulares e solúveis associados a diferentes haplótipos e fenótipos de anemia falciforme*”. O mesmo foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa da fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-HEMOAM) com o número CAAE 56413316.9.0000.0009.

Todos os participantes foram previamente esclarecidos sobre a importância deste estudo, e autorizaram a sua participação por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

4.6- Procedimentos

4.6.1- Coleta de Dados e do Material Biológico

A coleta de dados clínicos e demográficos foi realizada através de entrevista após o atendimento ambulatorial dos indivíduos com anemia falciforme (HbSS) na FHEMOAM, Estes pacientes foram abordados e convidados a participar da pesquisa. No aceite, assinaram em o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) sendo em seguida aplicado o questionário (Apêndice 2) que incluem informações consideradas relevantes para a obtenção de um perfil clínico e amplo da anemia falciforme (HbSS) da população de estudo. Neste questionário, os dados de interesse para este estudo incluem:

- Dados demográficos.
- Aspectos socioeconômicos,
- Sintomatologia.
- Quantidade de transfusões sanguíneas e reação transfusional.
- Dados referentes aos medicamentos usados para o tratamento da doença.

Em seguida foi agendada, conforme a disponibilidade do paciente, a coleta do material biológico (sangue) no Bloco A da FHEMOAM. 12 ml de amostra de sangue venoso periférico foi coletada por punção e armazenada em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (BD

Vacutainer® EDTA K2), Citrato de Sódio (BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado), gel separador (BD Vacutainer® gel separador) para a realização de exames hematológicos, polimorfismos do gene do receptor de inflamassoma NLRP3 (rs35829419 e rs10754558) e NLRP1 (rs26770660 e rs70754558) e polimorfismos dos genes das citocinas IL-1 β (rs187238) e IL-18 (rs16944).

4.6.2 - Cálculo do Escore de Gravidade

O escore de gravidade dos pacientes com anemia falciforme (HbSS) deste estudo já foi estabelecido através do trabalho de Purim Cesar apresentado nesta instituição em Abril/2017. (118)

4.6.3- Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi obtida das amostras do sangue periférico de leucócitos dos pacientes com anemia falciforme (HbSS) e do grupo controle. Utilizou-se o Kit Ilustra Blood GenomicPrep Mini Spin (cat 28-9042-65, GE Healthcare) seguindo as orientações descritas no protocolo do fabricante. Após a extração as amostras foram quantificadas em equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.) para a análise de concentração dos ácidos nucleicos e seu grau de pureza, sendo em seguida congeladas a uma temperatura de -20° C.

4.6.4- Detecção do Polimorfismo do Gene da Interleucina IL-18 (SNP: rs187238; região do gene: -137 G/C) e do gene IL-1 β (SNP: rs187238) pela Técnica PCR-RFLP

Após a extração do DNA genômico e sua quantificação para a análise da concentração de ácidos nucleicos e de seu grau de pureza em índices devidamente adequados (item 4.5.3), as amostras passaram por um processo de amplificação da região de interesse pela técnica de PCR-RFLP descrita por Folwaczny e colaboradores (2005), modificado por Kumar e colaboradores (2014).

A composição do Mix para a PCR dispunha de :

- 17,3 µL de H₂O (água) MiliQ;
- 2,5 µL de tampão de reação 10x;
- 17,3 µL de MgCL₂;
- 0,5 µL de primer IL-18F;
- 0,5 µL de primer IL-18R;
- 0,2 µL de Taq polimerase;

Após homogeneizar 1,0 µL de DNA extraído e 24 µL do Mix de PCR, as amostras foram levadas ao termociclador, para a amplificação do gene de interesse, e sua programação foi elaborada conforme descrita no Quadro 5.

O reação de PCR compreendeu no primeiro passo de desnaturação da dupla fita de DNA pela Taq polimerase ativada a temperatura de 95°C no qual esse primeiro ciclo teve a duração de 15 minutos. Seguido por 35 ciclos de desnaturação a uma temperatura de 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos. A extensão final foi conseguida a uma temperatura de 72°C e as amostras foram congeladas a 4°C.

Primes específicos foram utilizados para a amplificação do polimorfismo da região -137 e estão listados na Tabela 5.

Quadro 5 - Programação do termociclador para amplificação das amostras de DNA

Temperatura	Tempo	Ciclo
95 °C	15':00''	1°
94 °C	0:30''	35
60 °C	0:30''	
72 °C	0:90''	
72 °C	10:00''	1°
4 °C	∞	1°

Tabela 5- Descrição dos *Primers*, utilizados para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que deverão ser obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP) a uma temperatura de pareamento de 60°C.

IL ¹	LSR ² /ER ³	Primers	Sequências 5' → 3'	PCR	RFLR
IL-18	rs187238/ MboII	IL-18-F	CACAGAGCCCCAACTTTTTACGGCAGAGAA	155pb	155pb
		IL-18-R	GACTGCTGTCGGCACTCCTTGG		116pb
IL-1β	rs16944/Aval	IL-1β F	TGGCATTGATCTGGTTCATC	304pb	190pb
		IL-1β R	GTTTAGGAATCTTCCCACTT		104pb

1. Interleucina; 2. Localização dos sítios de restrição; 3. Enzima de restrição.

A composição do Mix da Reação de Restrição dispunha de:

- 7,7 µL de H₂O (água) MiiQ;
- 2,0 µL de tampão 10x Buffer4;
- 0,3 µL de Enzima MboII

Foram adicionados 15,0 µL dos produtos da amplificação do PCR em 10,0 µL do Mix das Reação de Restrição. Os produtos da amplificação foram clivados pela enzima MboII (enzima de restrição) a uma temperatura de 60°C, para a detecção do polimorfismo na região do gene -137. A digestão com essa enzima de restrição produziu fragmentos com tamanhos que correspondem a de 155 pb (para o alelo C); fragmentos de 116 pb (para o alelo G). estas amostras foram incubadas no termobloco e deixados por 4 horas a 37°C.

Para a determinação dos genótipos, as amostras foram analisadas por eletroforese em um gel de agarose a 2,5% corado com Brometo de etídeo.

Para análise da IL-18, em casos de indivíduos homozigóticos para o alelo C (C/C), somente uma banda do produto da PCR de 155 pb está presente. Em indivíduos homozigotos para o alelo G (G/G), uma banda do produto da PCR de 116 pb está presente. Em indivíduos heterozigóticos (G/C), duas bandas (155 pb e 116 pb) estão presentes.

Para análise da IL-1 β , em casos de indivíduos homozigóticos para o alelo T (T/T), somente uma banda do produto da PCR de 304 pb está presente. Em indivíduos homozigotos para o alelo C (C/C), uma banda do produto da PCR de 104 pb está presente. Em indivíduos heterozigóticos (C/T), duas bandas (190 pb e 104 pb) estão presentes.

4.6.5- Detecção do Polimorfismo do Gene NLRP1 (SNP: rs12150220; SNP: rs2670660) e NLRP3 (SNP: rs10754558; SNP: rs35829419) pela Técnica PCR de em tempo real qPCR)

Os polimorfismos do gene do receptor NLRP3 e NLRP1 foram feitos pela técnica de PCR em tempo real por meio dos ensaios TaqMan comercial (C_25648615_10; C_26052028_10; Applied Biosystems) com as sondas específicas para os SNPs mostrados no Quadro 6. As sondas possuem componentes fluorescentes e são capazes de reconhecer sequências dos polimorfismos nos fragmentos de DNA amplificado durante a qPCR. Os iniciadores e o protocolo que serão utilizados na qPCR, estão descritos por Pontillo et al., (2012, 2013 e 2015).

Para a reação de PCR foi utilizado o termociclador da *Applied Biosystems (StepOne plus® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)*, primers e sondas específicos contidos nos ensaios para cada gene (Quadro 6).

Quadro 6- Descrição dos genes, referência dos SNPs, localização e kit de ensaio para genotipagem.

Gene	Referência do SNP (rs)	Localização/ Sequência da Sonda [VIC/FAM]	Kit de genotipagem de ensaio TaqMan
NLRP3 <i>Q705K</i>	rs35829419	Chr.1: 247588858 GGAAGGCCGACACCTTGATATGGTG[A/C]AGTGTGT CCTCCAAGCTCCTCTCA	C_25648615_10
NLRP3 <i>3'UTR</i>	rs10754558	Chr.1: 247612036 GACAATGACAGCATCGGGTGTGTT[C/G]TCAT CACAGCGCCTCAGTTAGAGGA	C_26052028_10
NLRP1	rs12150220	Chr.17: 5582047 GGAGCTTGGAAGAGCTTGGTAGAGG[A/T]GTG AGGCAGAGATTTCTGGGGGAA	C__1600653_10
NLRP1	rs2670660	Chr.17: 5615686 ACAAGTGATCTACCAGTCTTTTAAA[A/G]TTCT ATTATTTAAAACCCAACATGC	C_1600689_10

4.6.6– Análise Estatística

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas, onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados categóricos. Na análise dos dados quantitativos, quando aceita a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a média e o desvio-padrão (Dp), já no caso da rejeição da hipótese de normalidade foi calculada a mediana e os desvios quartis (Q_i). Na comparação das medianas em relação as variáveis categóricas foram aplicados os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*. Na análise da associação entre os dados clínicos e a classificação do escore de gravidade foi aplicado o teste exato de *Fisher*. Já na análise da correlação entre as variáveis quantitativas foi calculado o coeficiente de correlação de *Spearman* (VIEIRA, 2004).

O software utilizado na análise da maioria dos dados foi o programa *Minitab* versão 17 para *windows* e o nível de significância fixado na aplicação dos testes estatísticos foi de 5%.

5- RESULTADOS

5.1– Características Demográficas

Foram analisados um total de 21 indivíduos portadores de Anemia Falciforme (Hb SS) e 50 indivíduos do grupo controle, sendo o grupo controle usado somente para análises comparativas dos polimorfismos dos genes estudados. A tabela 6 mostra a os dados demográficos dos indivíduos portadores de anemia falciforme.

Tabela 6- - Características demográficas dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo

Características demográficas	fi	%
(n=21)		
Gênero		
Masculino	15	71,4
Feminino	6	28,6
Idade (anos)		
20 --- 30	9	42,9
20 --- 30	8	38,1
40 --- 50	4	19,0
Média ± Dp	31,5 ± 9,4	
Naturalidade		
Manaus	8	38,1
Interior do AM	4	19,0
Outros Estados	9	42,9
Estado civil		
Solteiro	13	65,0
Casado/União estável	5	25,0
Divorciado	2	10,0
Raça		
Branca	1	5,3
Parda	16	84,2
Negra	2	10,5

fi= frequência absoluta simples; Dp= desvio padrão.

A faixa etária em geral foi de aproximadamente 31 anos. Em relação ao gênero, houve maior predomínio do sexo masculino (71,4%). Indivíduos provenientes de outros estados que fazem o seu tratamento e acompanhamento na FHEMOAM foram maiores (42,9%) quando comparados àqueles que são naturais da capital do estado do Amazonas. A grande maioria se declarou solteiro (65%) e a raça parda é mais prevalente entre os indivíduos do estudo (84,2%).

5.2 – Características Socioeconômicas

Mais da maioria dos indivíduos tem o ensino fundamental (56,2%), tem renda familiar que varia de 1 a 3 salários mínimos (70,6%) e a média do número de pessoas residentes no município foi de $3,3 \pm 1,6$. (Tabela 7)

Tabela 7- Características socioeconômicas dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo

Características sócioeconômicas	fi	%
(n=21)		
Escolaridade		
Ensino fundamental	6	37,5
Ensino médio	9	56,2
Ensino superior	1	6,3
Renda (em salários mínimos)		
1 --- 3	12	70,6
3 --- 10	3	17,6
Não sabe	2	11,8
Número de moradores no domicílio		
1 --- 2	6	70,6
3 --- 4	10	17,6
5 --- 7	3	84,2
Média \pm Dp	$3,3 \pm 1,6$	

fi= frequência absoluta simples; Dp= desvio padrão.

5.3– Características laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme

Os parâmetros hematológicos das células da série vermelha e branca dos pacientes portadores de anemia falciforme são demonstrados na figura 18. Como pode ser observado, em média, os pacientes apresentam uma anemia normocrômica-normocítica (valor médio da hemoglobina de 7,5 g/dL – Vr. 13 a 16 g/dL; com valores médios de VCM de 100,0 fl - Vr. 80 a 100 fl ; e HCM de 34 g/dL - Vr. 26 a 34 g/dL). A média do valor RDW (18,3 % - Vr. 11,5 a 15%) está aumentado indicando uma anisocitose. A contagem de leucócitos está dentro dos valores normais de referência (média de 6,3 x 10³/μL – Vr. 5000 a 10000 10³/μL) e há uma leve plaquetose (média de 420 10³/μL – Vr 140 a 400 10³/μL).

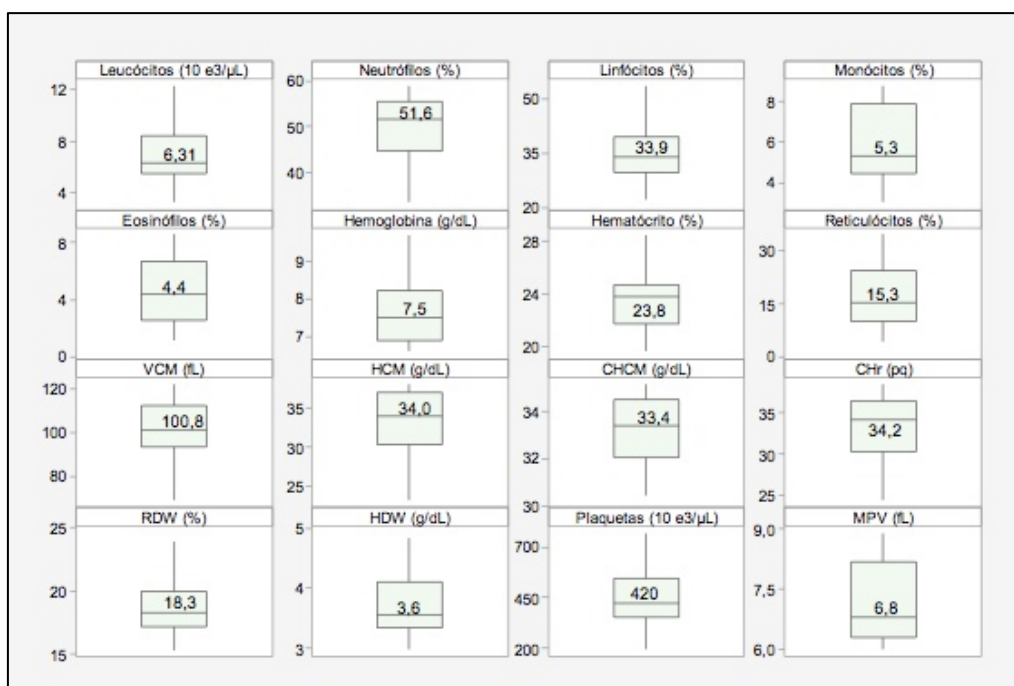


Figura 18 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.

5.4– Características laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme e dos pacientes saudáveis.

Tabela 8 - Mediana dos exames laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme e do grupo controle (pacientes saudáveis) da população de estudo

Exames laboratoriais	Grupo		p
	Caso Q ₁ – Mediana – Q ₃	Controle Q ₁ – Mediana – Q ₃	
Leucócitos (10 e3/μL)	6,0 – 6,3 – 8,2	5,4 – 6,3 – 7,0	0,487
Neutrófilos (%)	45,4 – 51,6 – 55,5	50,1 – 56,4 – 61,6	0,001
Linfócitos (%)	29,7 – 33,9 – 39,3	26,4 – 29,7 – 34,3	0,008
Monócitos (%)	4,5 – 5,3 – 7,7	5,1 – 5,9 – 6,6	0,904
Eosinófilos (%)	3,0 – 4,4 – 6,1	2,1 – 3,1 – 5,8	0,418
Hemoglobina (g/dL)	6,9 – 7,5 – 8,0	13,6 – 14,9 – 16,0	<0,001
Hematócrito (%)	21,7 – 23,8 – 24,6	40,6 – 43,7 – 47,2	<0,001
VCM (fL)	93,6 – 100,8 – 111,9	85,0 – 87,8 – 90,4	<0,001
HCM (pg)	30,4 – 34,0 – 36,9	29,0 – 29,7 – 30,5	<0,001
CHCM (g/dL)	32,2 – 33,4 – 34,5	33,1 – 34,0 – 34,6	0,150
RDW (%)	17,3 – 18,3 – 19,8	13,0 – 13,7 – 13,9	<0,001
MPV (fL)	6,3 – 6,8 – 8,2	7,1 – 8,1 – 8,6	<0,002
Plaquetas (10 e3/μL)	362 – 420 - 533	216 – 244 - 281	<0,001

Na análise da Tabela 8 observa-se que houve diferença estatística entre as medianas do grupo dos casos em relação aos do grupo controle na série vermelha (hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, RDW, MPV e Plaquetas) e na série branca (especificamente no diferencial de neutrófilos e linfócitos).

5.5– Informações sobre o diagnóstico inicial e complicações em indivíduos portadores de anemia falciforme

No contexto do diagnóstico inicial da anemia falciforme, mais da maioria (58,8%) do universo de indivíduos que souberam referir a este inquérito, foram diagnosticados com menos de 5 anos de idade e referiram as complicações da doença como a causa da procura pelo diagnóstico. O FHEMOAM destaca-se pelo centro em que foi feito o diagnóstico. (Tabela 9)

Tabela 9 - Informações sobre o diagnóstico inicial e complicações da anemia falciforme na população de estudo.

Informações sobre o diagnóstico inicial e complicações da anemia falciforme (n=16)	f _i	%
Idade do diagnóstico em anos (n=17)		
<1	6	35,3
1 --- 5	4	23,5
5 --- 10	3	17,7
10 --- 20	1	5,9
20 --- 40	3	17
Q ₁ – Mediana – Q ₃	0,0 – 1 – 9,0	
Contexto da suspeita diagnóstica		
Complicações	15	93,8
Triagem	1	6,2
Local do diagnóstico		
Hemoam	9	56,2
Outro local	7	43,8

O universo de indivíduos (n) inclui aqueles que souberam referir sobre o inquérito no contexto do diagnóstico da doença e sobre suas as complicações.
f_i= frequência absoluta simples; Dp= desvio padrão; Q_i = quartis.

Quanto as complicações inerentes à fisiopatologia da anemia falciforme, há destaque para a colelitíase (56,2%) que acometeu mais da metade do universo dos entrevistados. Um dado importante na caracterização clínica de pacientes com anemia falciforme é o número de crise vaso-oclusivas nos últimos 12 meses. A frequência desta e de demais complicações é mostrado na tabela 10.

Tabela 10 - Informações sobre complicações da anemia falciforme na população de estudo

Informações sobre o diagnóstico inicial e complicações da anemia falciforme (n=16)	fi	%
Crises vaso-oclusivas nos últimos 12 meses	S	
0	4	25,0
1 à 3	7	43,8
5 à 6	4	25,0
7 à 10	1	6,2
Q ₁ – Mediana – Q ₃	0,5 – 2,0 – 5,0	
Úlceras de perna	6	37,5
Priapismo (n=15)	2	12,5
Colelitíase	9	56,2
Sequestro esplênico	5	31,2
AVC isquêmico	1	6,2
Osteonecrose da cabeça do fêmur	4	26,7
Uso de Hidroxiuréia (n=20)	18	90,0

5.6– Informações sobre os valores da mediana da hemoglobina fetal e da hemoglobina S em indivíduos portadores de anemia falciforme

Considerando os valores da hemoglobina fetal (Hb F) e da hemoglobina S (Hb S) como fatores moduladores da gravidade da evolução clínica de indivíduos portadores de anemia falciforme, optamos por avaliar a mediana de seus valores na população de estudo. O valor médio da hemoglobina fetal nos pacientes foi de 7,6% e de hemoglobina S foi de 85,4% (figura 19)

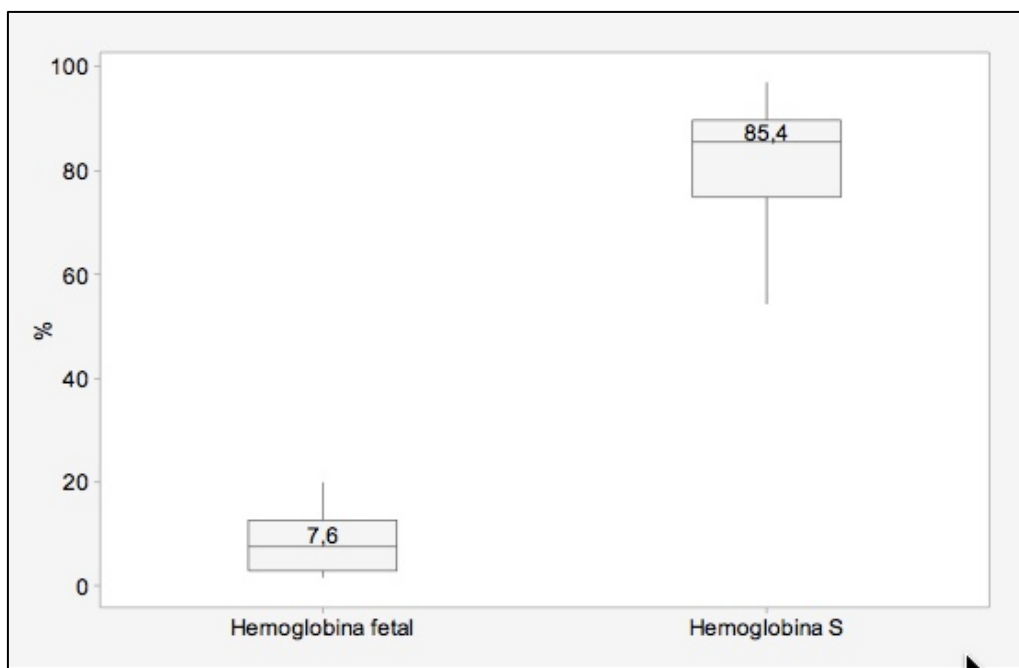


Figura 19 - Valores da mediana da hemoglobina fetal (HbF) e Hemoglobina S (HbS) dos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.

5.7– Correlação entre marcadores clássicos de gravidade de indivíduos portadores de anemia falciforme

Considerando a importância da hemólise na fisiopatologia da anemia falciforme, também optamos por avaliar se a contagem de reticulócitos apresenta correlação estatística com outros biomarcadores laboratoriais (hemoglobina fetal, leucócitos e plaquetas). Também avaliamos se os valores da hemoglobina fetal tem correlação com a quantidade de leucócitos e plaquetas. O coeficiente de correlação (r) entre reticulócitos e a hemoglobina fetal foi de $r=-0,72$; entre reticulócitos e leucócitos foi de $r=-0,07$; entre reticulócitos e plaquetas foi de $r=0,15$. O coeficiente de correlação entre hemoglobina fetal e leucócitos foi de $r=-0,44$; entre hemoglobina fetal e plaquetas foi de $r=-0,13$. (figura 20)

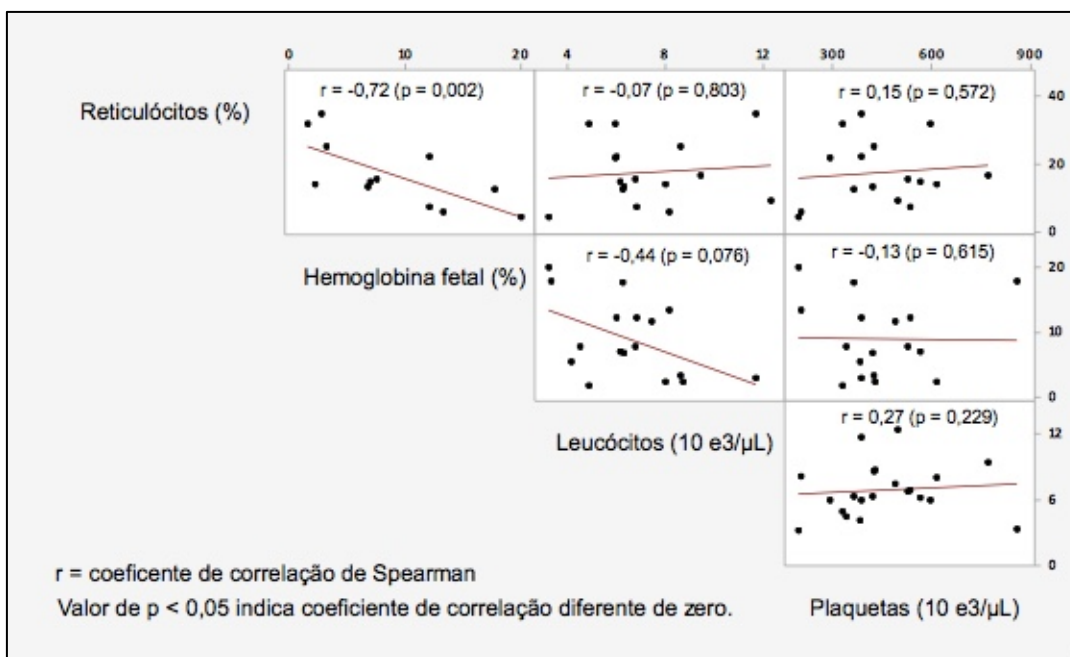


Figura 20 - Correlação entre a contagem de reticulócitos e biomarcadores laboratoriais nos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.

5.8- Análise do escore de gravidade e sua associação com marcadores laboratoriais e clínicos em indivíduos portadores de anemia falciforme

O escore de gravidade foi estabelecido na população de estudo utilizando informações das variáveis clínicas e laboratoriais (variáveis estas descritas no Quadro 3) presentes nos prontuários dos indivíduos e inserindo os valores na calculadora (disponível no <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/projects>). Este modelo considera o risco de morte em 5 anos como escore de gravidade da AF e estabelece a faixa de risco que varia na faixa de 0 (pouco grave) à 1 (muito grave).

Com o objetivo de classificar o escore de gravidade dos indivíduos dentro de um fenótipo de classes (Leve, Intermediária ou Grave) foi utilizada uma faixa de escore estabelecida por Sebastiani e colaboradores (2007)⁽⁶⁴⁾ e adaptada ao nosso estudo. A classificação foi baseada na observação de que o escore de gravidade tem uma curva em forma de “U” que sofre mudanças de acordo com a idade da população em que é aplicada. Portanto, os escores $\leq 0,4$ são classificados como “Leves”, independentes da idade do indivíduo. Os escores $> 0,8$ para pacientes com idade > 40 anos e escores $\geq 0,6$ para pacientes ≤ 40 anos são considerados “Graves”. Para pacientes > 40 anos, o escore $> 0,8$ foi considerada

“Grave” para reduzir o risco uma classificação equivocada. Os escores que não correspondem a “Leve” ou “Grave” são classificados como “Intermediário” (Figura 21.)

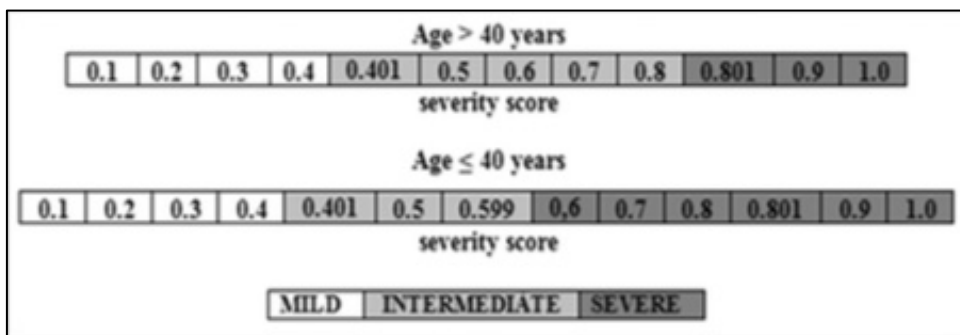


Figura 21 - Faixa dos escores de gravidade para classificação dos fenótipos de acordo com a faixa etária em “Leve”, “Intermediária” e “Grave”

Fonte:

Cameron BF, Christian E, Lobel JS, Gaston MH. Evaluation of clinical severity in sickle cell disease. J Natl Med Assoc [Internet]. 1983 May [cited 2017 Aug 15];75(5):483–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6864827>

Após determinar o fenótipo de gravidade na nossa população de estudo, encontramos que 33,3% tem fenótipo intermediário, 5,6% tem fenótipo leve e 61,1% tem fenótipo grave. (figura 22)



Figura 22 - classificação do fenótipo de gravidade com base no escore de risco nos indivíduos portadores de anemia falciforme na população de estudo.

Tabela 11 - Mediana dos exames laboratoriais dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade da população de estudo

Exames laboratoriais	Grupo		p*
	Leve/Intermediária Q ₁ – Mediana – Q ₃	Grave Q ₁ – Mediana – Q ₃	
Reticulócitos(%)	5,7 – 22,4 – 32	13,1 – 14,6 – 18,8	0,660
Hemoglobina (g/dL)	6,8 – 8,4 – 9,0	7,2 – 7,5 – 7,9	0,586
Hematócrito	22,5 – 24,5 – 28,5	21,7 – 23,5 – 24,3	0,113
Leucócitos (10 e3/μL)	4,5 – 6,0 – 8,2	6,0 – 6,3 – 8,0	0,751
Hemoglobina fetal (%)	2,8 – 11,6 – 13,4	3,2 – 6,9 – 12,2	0,525
Hemoglobina S (%)	82,5 – 85,4 – 93,0	72,8 – 84,8 – 89,7	0,447
Plaquetas (10 e3/μL)	200 – 339- 384	381 – 424 – 562	<i>0,026</i>

Q_i = quartis; * Teste não paramétrico de Mann-Whitney

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatística com nível de 5% de significância

De acordo com a tabela 11 não houve diferença estatística entre os valores das medianas de reticulócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, hemoglobina fetal e hemoglobina S em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade (leve/intermediária *versus* Grave). A única variável laboratorial em que pode ser observada diferença estatística foi no valor da mediana da contagem de plaquetas.

Como demonstra a Tabela 12, podemos observar que não houve diferença estatística entre os valores das complicações clínicas (crises nos últimos 12 meses, úlceras de perna, priapismo, colelitíase, sequestro esplênico, AVC isquêmico e osteonecrose da cabeça do fêmur) em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade (leve/intermediária *versus* Grave).

Tabela 12 - Distribuição da frequência das complicações clínicas dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade da população de estudo

Complicações clínicas	Escore de gravidade				Total	p*
	Leve/Intermediária		Grave			
	f _i	%	f _i	%		
Crise nos últimos 12 meses						0,999
Sim	3	75,0	1	25,0	4	
Não	7	58,3	5	41,7	12	
Úlceras de perna						0,606
Sim	3	50,0	3	50,0	6	
Não	7	70,0	3	30,0	10	
Priapismo						0,500
Sim	2	100	-	-	2	
Não	8	57,2	6	42,9	14	
Colelitíase						0,999
Sim	6	66,7	3	33,3	9	
Não	4	57,1	3	42,9	7	
Sequestro esplênico						0,999
Sim	3	60,0	2	40,0	5	
Não	7	64,6	4	36,4	11	
AVC isquêmico						0,375
Sim	-	-	1	100,0	1	
Não	10	66,7	5	33,3	15	
Osteonecrose da cabeça do fêmur						0,231
Sim	4	100,0	-	-	4	
Não	6	54,6	5	45,4	11	

f_i= frequência absoluta simples; * Teste exato de Fisher.

5.9- Análise da frequência polimorfismos dos genes das interleucinas IL-1 β , IL-18 e dos polimorfismos dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 nos indivíduos portadores de anemia falciforme

Os seguintes SNP's foram genotipados com êxito: IL-18 (rs16944) em 18 amostras; IL-1 β (rs187238) em 19 amostras; NLRP1 (rs12150220) em 19 amostras; NLRP1 rs2670660 em 19 amostras; NLRP1 (rs2670660) em 19 amostras e NLRP3 (rs35829419) em 19 amostras.

Todos os SNPS's apresentaram 2 genótipos homocigotos (um selvagem e um mutado) e 1 genótipo heterocigoto mutado; com excessão do NLRP3 (rs35829419) que apresentou 1 genótipo heterocigoto mutado e um genótipo homocigoto selvagem. As frequências genóticas dos polimorfismos destes indivíduos portadores de anemia falciforme está sumarizada na tabela 13.

5.10- Análise da frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 no grupo de indivíduos portadores de anemia falciforme (caso) e no grupo de indivíduos sadios (controle).

A tabela 14 demonstra que quando comparamos os valores de genotipagem dos SNP's dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 entre o grupo de pacientes e o grupo controle não houve diferença estatística para os genes NLRP1 (rs12150220; rs2670660) e NLRP3 (rs10754558; rs35829419)

Tabela 13 - Frequência genotípica dos polimorfismos dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 do grupo de pacientes portadores de anemia falciforme.

SNP's	fi	%
IL-18 rs16944 (n=18)		
C/C	9	50,0
G/C	8	44,4
G/G	1	5,6
IL-1β rs187238 (n=19)		
C/C	4	21
C/T	12	63,2
T/T	3	15,8
NLRP1 rs12150220 (n=19)		
A/A	7	36,8
A/T	8	42,1
T/T	4	21
NLRP1 rs2670660 (N=19)		
A/A	7	36,8
A/G	10	52,6
G/G	2	10,5
NLRP3 rs10754558 (n=20)		
C/C	12	60,0
C/G	7	35,0
G/G	1	5,0
NLRP3 rs35829419 (n=19)		
A/C	7	10,5
CC	10	89,5

fi= frequência absoluta simples

Tabela 14 - Distribuição da frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 dos indivíduos portadores de anemia falciforme e dos indivíduos do grupo da população de estudo

SNP's	Grupos				Total	p
	Casos		Controles			
	f _i	%	f _i	%		
NLRP1 rs12150220						0,857*
A/A	7	28,0	18	72,0	25	
A/T	8	25,0	24	75,0	32	
T/T	4	33,3	8	66,7	12	
NLRP1 rs2670660						0,587*
A/A	7	33,3	14	66,7	21	
A/G	10	27,8	26	72,2	36	
G/G	2	16,7	10	83,3	12	
NLRP3 rs10754558						0,662*
C/C	12	29,3	29	70,7	41	
C/G	7	31,8	15	68,2	22	
G/G	1	14,3	6	85,7	7	
NLRP3 rs35829419						0,611**
A/C	2	40,0	3	60,0	5	
CC	17	26,6	47	73,4	64	

f_i = frequência absoluta simples; * Teste do qui-quadrado; ** Teste exato de Fisher.

5.11 - Frequência dos SNP's dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 na classificação segundo o fenótipo de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme

Analisou-se frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamassomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 na classificação segundo o fenótipo de gravidade do grupo de pacientes portadores de anemia falciforme. Com exceção de 2 SNP's (IL-18-rs16944 e NLRP3 rs35829419), todos ou outros apresentaram 2 genótipos

homozigostos (um selvagem e um mutado) e 1 genótipo heterozigoto mutado. As frequências genóticas destes SNP's no escore de gravidade está sumarizada na tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição da frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade da população de estudo

SNP's	Escore de gravidade				Total	p
	Leve/Intermediária		Grave			
	f _i	%	f _i	%		
IL-18 rs16944						0,329*
C/C	7	77,8	2	22,2	9	
G/C	3	50,0	3	50,0	6	
L-1β rs187238						**
C/C	3	75,0	1	25,0	4	
C/T	7	63,6	4	36,4	11	
T/T	-	-	1	100,0	1	
NLRP1 rs12150220						**
A/A	3	50,0	3	50,0	6	
A/T	4	57,1	3	42,9	7	
T/T	2	66,7	1	33,3	3	
NLRP1 rs2670660						**
A/A	3	50,0	3	50,0	6	
A/G	4	50,0	4	50,0	8	
G/G	2	100,0	-	-	2	
NLRP3 rs10754558						**
C/C	6	66,7	3	33,3	9	
C/G	4	57,1	3	42,9	7	
G/G	-	-	1	100	1	
NLRP3 rs35829419						0,999*
A/C	1	50,0	1	50,0	2	
CC	8	57,1	6	42,9	14	

f_i = frequência absoluta simples; * Teste exato de Fisher; ** Não foi possível aplicar a estatística de teste devido as restrições de Cochran (VIEIRA, 2004).

A Tabela 15 demonstra que quando comparamos os valores de genotipagem dos SNP's dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e das interleucinas IL-1 β e IL-18 entre o grupo de pacientes e o grupo controle não houve diferença estatística para os genes dos inflamassomas NLRP1 (rs12150220; rs2670660) e NLRP3 (rs10754558; rs35829419) e das interleucinas IL-1 β (rs187238) e IL-18(rs16944).

5.12- Frequência dos SNP's dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 nos marcadores laboratoriais clássicos de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme

Analisou-se frequência dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 e dos genes das interleucinas IL-1 β e IL-18 no valor da mediana dos marcadores laboratoriais clássicos de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme (série vermelha: hemoglobina, hemaócrito, VCM, HCM, CHCM, CHr, HDW, reticulócitos, RDW; e série branca: Leucócitos (e seus diferenciais), plaquetas). Com exceção do SNP's NLRP3 (rs35829419), todos ou outros apresentaram 2 genótipos homozigostos (um selvagem e um mutado) e 1 genótipo heterozigoto mutado. As frequências genótípicas destes SNP's no valor da mediana dos marcadores laboratoriais clássicos de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme está sumarizada nas figuras 23 à 28.

De acordo como observado na figura 23, não houve associação estatística entre os marcadores clássicos de gravidade da anemia falciforme e o SNP do inflamassoma NLRP3 (rs35829419).

De acordo como observado na figura 24, não houve associação estatística entre os marcadores clássicos de gravidade da anemia falciforme e o SNP do inflamassoma NLRP3 (rs10754558).

De acordo como observado na figura 25, não houve associação estatística entre os marcadores clássicos de gravidade da anemia falciforme e o SNP do inflamassoma NLRP1 (rs12150220).

De acordo como observado na figura 26, não houve associação estatística entre os marcadores clássicos de gravidade da anemia falciforme e o SNP do inflamassoma NLRP1 (rs2670660)

De acordo como observado na figura 27, só houve associação estatística entre o HDW e RDW e o SNP da IL-1 β (rs187238)

De acordo como observado na figura 28, não houve associação estatística entre os marcadores clássicos de gravidade da anemia falciforme e os SNP IL-18(rs16944).

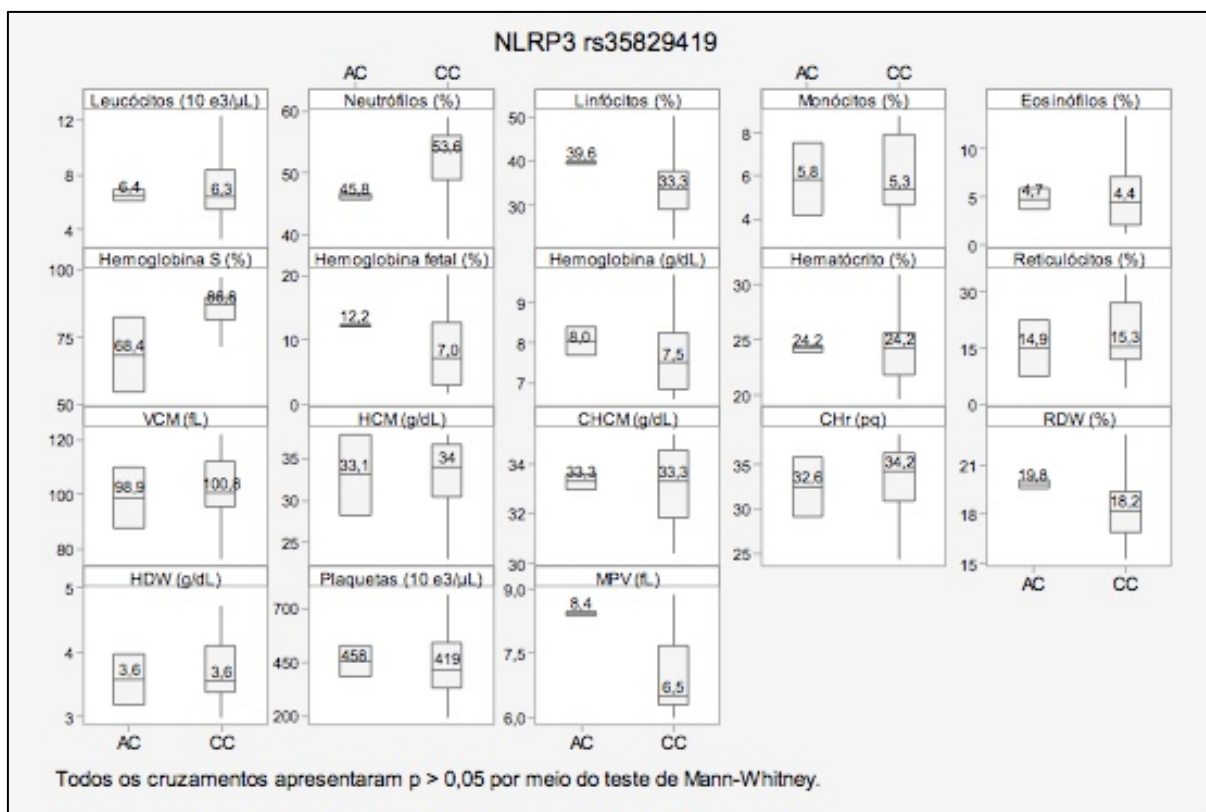


Figura 23 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP3 rs35829419.

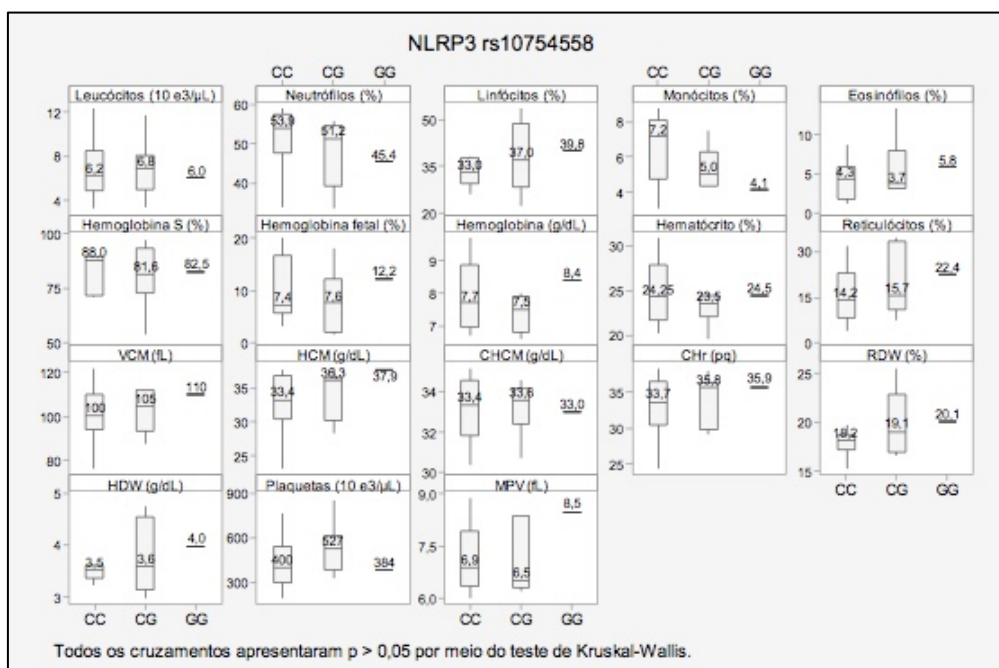


Figura 24 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP3 rs10754558.

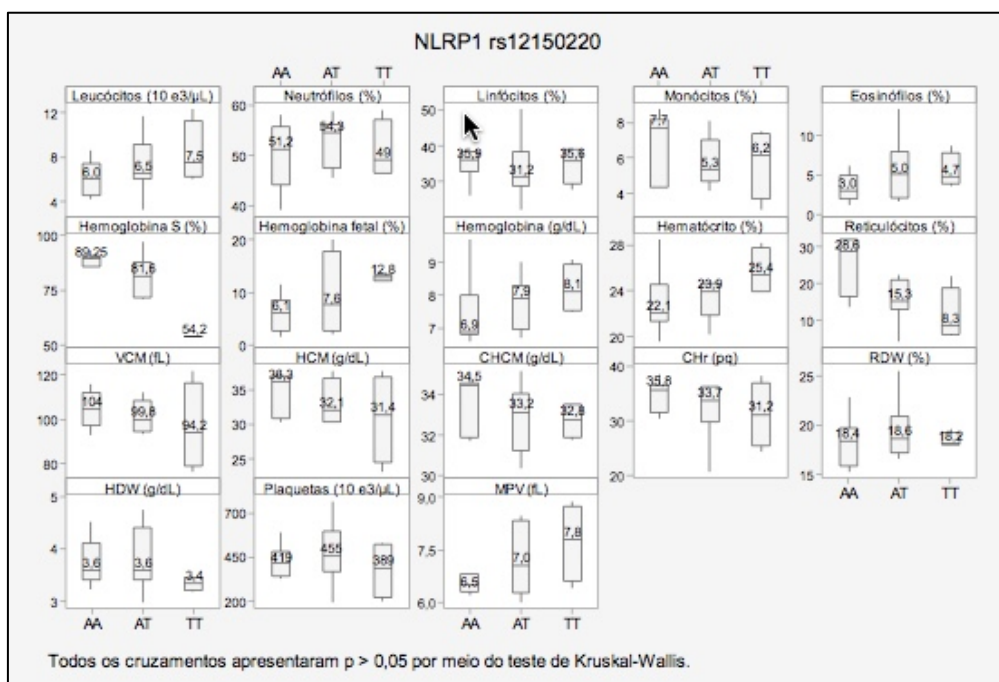


Figura 25 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP1 rs12150220.

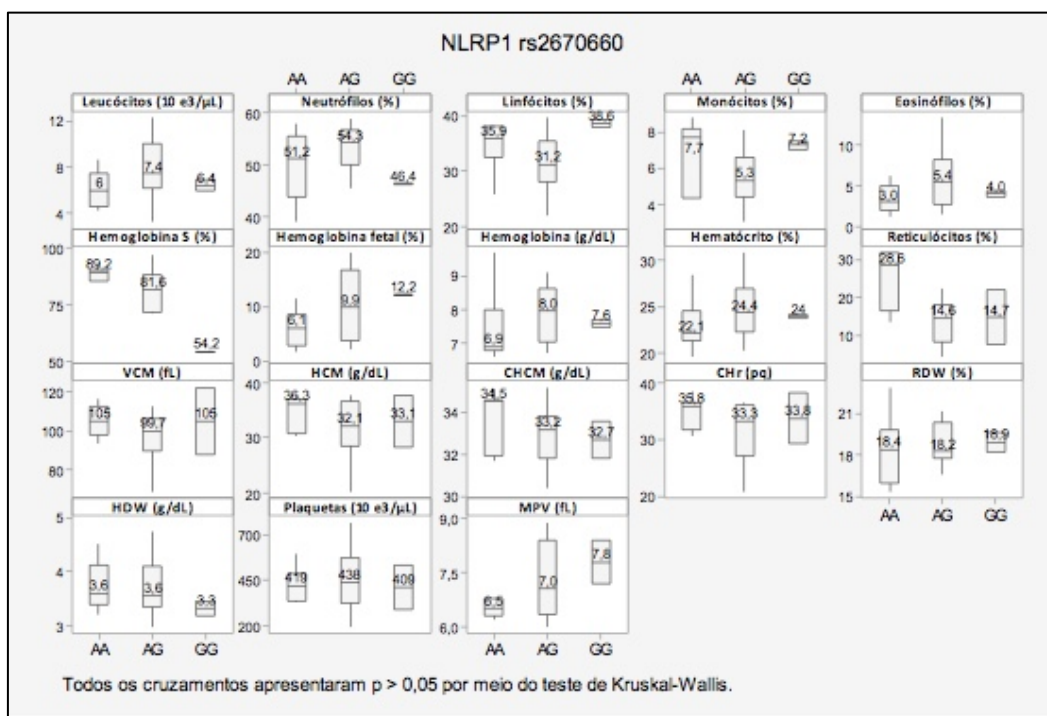


Figura 26 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do inflamassoma NLRP1 rs2670660.

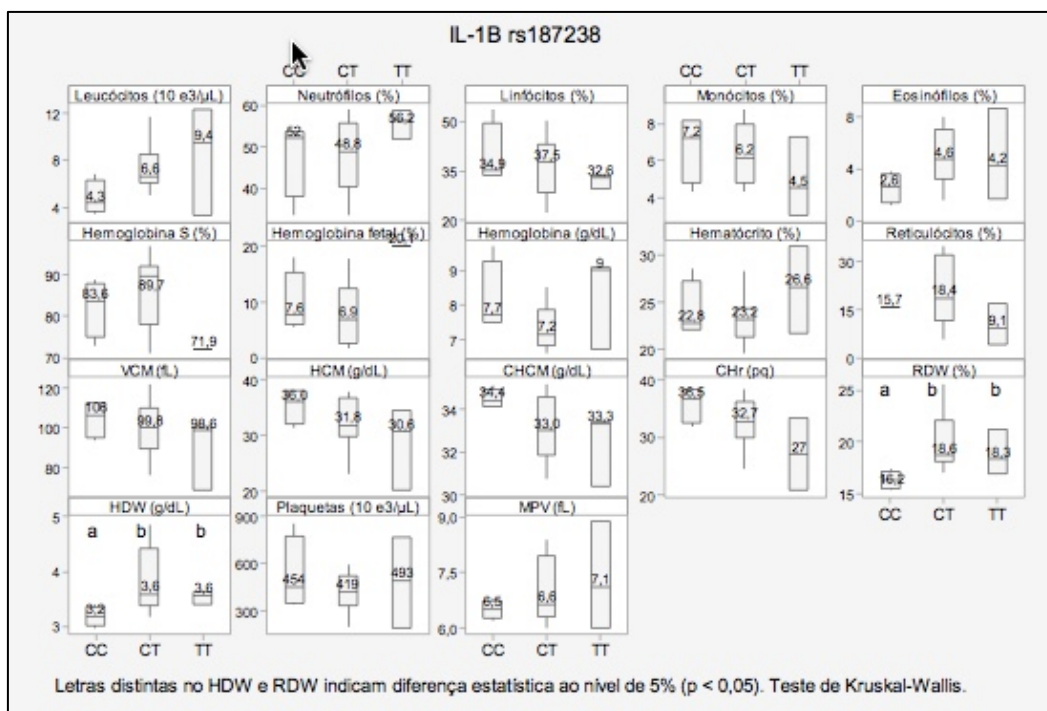


Figura 27 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do da IL-1 β rs187238.

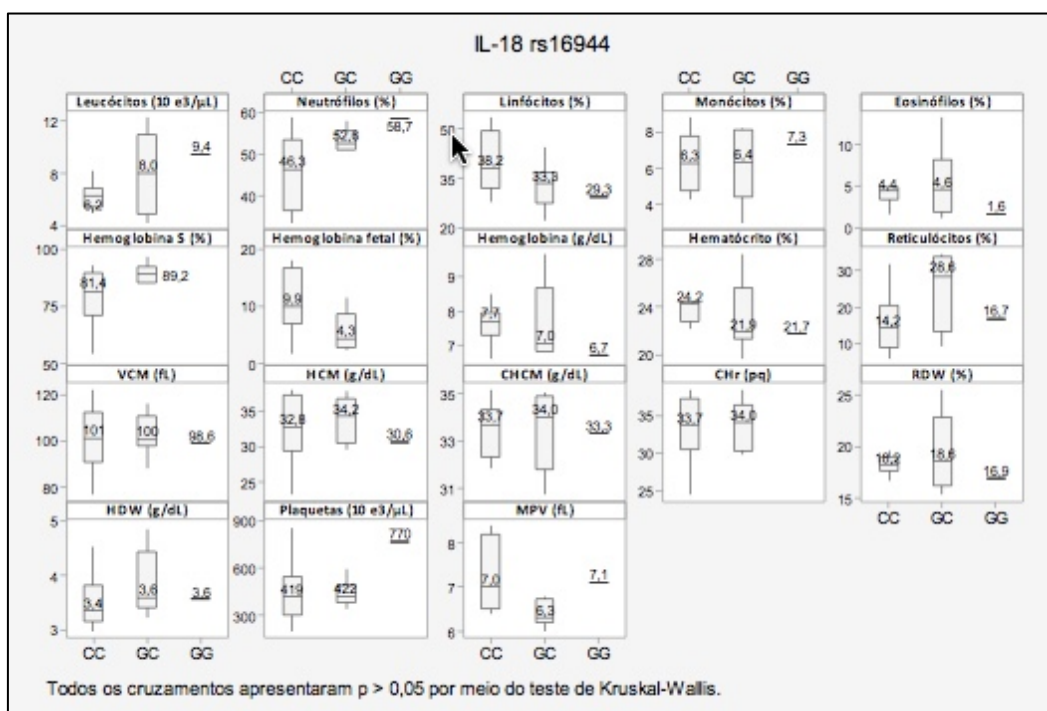


Figura 28 - Mediana dos parâmetros laboratoriais hematológicos de células da série branca e vermelha na população de estudo dos indivíduos portadores de anemia falciforme em relação ao polimorfismo do gene do da IL-18 rs16944.

6- DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma desordem hemolítica herdada geneticamente e é caracterizada por uma inflamação crônica.⁽¹²⁰⁾ A expressão de citocinas inflamatórias afeta a via fundamental que contribui para a patogênese da doença. Na anemia falciforme há sempre o estado “pro-inflamatório” (que pode ser definido quando pacientes estão em estado clínico estável-steady state).⁽⁵⁵⁾ No entanto, o fenômeno de falcização do eritrócito, sua hemólise e liberação do componente heme potencializa a resposta inflamatória o que origina todas as consequências apresentadas pelas crises vaso-oclusivas em paciente em estado crítico – painfull crisis.⁽¹²¹⁾ Deste modo, o sistema imune exerce um importante papel nessa condição inflamatória com a participação das células do sistema imune (monócitos, linfócitos e polimorfonucleares) que secretam inúmeras citocinas inflamatórias (entre elas a IL-1 β e IL-18, objetos deste estudo). Há nestas células do sistema imune receptores e moléculas que juntos formam o complexo molecular chamado de inflamassoma (entre elas os inflamossomas NLRP1 e NLRP3) em resposta a estímulos de antígenos próprios e não próprios nos seus PRR’s. Os inflamossomas ativam uma classe de caspases conhecidas como caspases inflamatórias, cuja atividade proteolítica promove a conversão da IL-1 β e IL-18 para as suas formas ativas.⁽¹⁰²⁾

- Polimorfismo no gene da IL-1 β

Na literatura há descrições que polimorfismos no gene que codificam as proteínas da família da interleucinas IL-1 e que alteram o curso de múltiplas doenças humanas, tanto de caráter imunoinflamatório quanto de caráter infeccioso. Muitos trabalhos tem focado no estudo na variabilidade genética na região promotora dos genes das citocinas, particularmente na identificação de SNPs, o qual podem afetar a expressão genética como um todo⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾. Chi DZ e colaboradores (2015) investigando a associação entre 4 polimorfismos de regiões da IL-1 β (IL-1 β +3954 C/T – rs1143634; IL-1 β -511 C/T – 16944) e (IL-6 -174 G/C –rs800795; IL-6 -634 C/C rs1800796) e o risco de aumento de pancreatite aguda em um coorte de indivíduos de população chinesa⁽¹²²⁾ foi evidenciado que o grupo de indivíduos carregando o genótipo IL-1 β rs1143634 TT apresentavam um risco significativo de aumento no número de casos da doença. Está bem estabelecido que o a infecção por *Helicobacter pylori* está associada com câncer gástrico e duodenal. A hipocloridria induzida pelo *H. pylori* predispões ao aparecimento da doença. Em 2012, pesquisadores estabeleceram a relação entre

o polimorfismo do gene da IL-1 β (que neste caso específico aumentava a produção da citocina) com a presença do *H. pylori* e porque alguns indivíduos podem apresentar a doença ou não.⁽¹²³⁾ Em indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária, tem mais suscetibilidade de desenvolver ou não a doença frente ao polimorfismo nessa família de genes.⁽¹²⁴⁾

Em nosso estudo, os SNP's da IL-1 β rs187238 genótipo CC (75%) foram mais frequentes em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade “Leve/Intermediário” em indivíduos portadores de anemia falciforme, seguido de genótipo C/T (63,6%) – Tabela 15. Vale ressaltar que a frequência deste SNP e desses fenótipos, respectivamente nos indivíduos foi de 4% e 63%. O genótipo TT, mesmo com uma frequência intermediária (15,8%), não teve dados demonstrativos nesta classificação (leve/intermediária) mas, em contrapartida, foi registrado 1 caso na classificação “Grave”.

Perla vicari e colaboradores (2014) estudando a associação entre o polimorfismo do gene da IL-1 β e IL-6 com as manifestações clínicas da anemia falciforme em 107 indivíduos portadores da doença concluiu que não houve associação entre a maioria das manifestações clínicas da doença (colelitíase, úlceras de membros inferiores, acidente vascular cerebral isquêmico, hipertensão pulmonar, síndrome torácica aguda e retinopatia); com exceção para a osteonecrose da cabeça do fêmur que só teve um nível de significância ($p=009$) no polimorfismo de uma posição do gene da IL-1 β entre duas analisadas: a IL-1 β +3954CnT (rs1143634). (117) . No entanto, em um artigo posterior (*Corrigendum*) deste trabalho, retifica que este achado não tem evidências de associação suficiente devido a proporção do alelo T/T do SNP da IL-1 β +3954CnT ser menos frequente nos casos do que nos controles, levando à conclusão de que nenhum SNP, tanto da IL-1 β quanto da IL-18 exercem influência nas manifestações clínicas da A.F.

Em nosso estudo, igualmente, não foi observado nenhuma associação entre a frequência das complicações clínicas dos pacientes portadores de anemia falciforme em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade (Tabela 15). O mesmo se reflete quando fazemos a análise do polimorfismo do gene da L-1 β rs187238 com a média dos parâmetros laboratoriais clássicos de gravidade da anemia falciforme (Figura 27), com exceção de dois únicos parâmetros: HDW e RDW.

- Polimorfismo no gene da IL-18

A IL-18 também exerce influência na apresentação clínica das doenças humanas. Hepatites virais C e B e polimorfismos da IL-18 já tem seu relato descrito na literatura. Kamper Nunes dos Santos e colaboradores (em 2015) avaliaram a presença do polimorfismo dos genes da IL-18 -137 G/C e IL-18 -607 C/A em um estudo de caso (envolvendo pacientes infectados com hepatite C) e controles. Encontraram que pacientes que possuíam o genótipo C/A na posição -607 apresentavam alto risco de infecção viral pelo vírus da hepatite C.⁽¹²⁵⁾ Vijay Kumar Karra e colaboradores avaliando os polimorfismos nas posições -607 e -137 concluíram que indivíduos que possuíam o alelo A poderia ter fator de proteção contra a hepatite B e o mais interessante é que indivíduos que possuíam o genótipo homocigótico AA estavam associados a regressão espontânea da doença. Mas devemos ter em mente que nem sempre a presença do polimorfismo nesta citocina esta associada a fatores benéficos ou maléficos em relação ao curso clinico da patologia. Folwaaczny e colaboradores (2005), observaram em seu trabalho que a associação entre seis diferentes tipos de polimorfismos da IL-18 não está associada com doença periodontal destrutiva.⁽¹⁰⁷⁾

Em nosso estudo, os SNP's da IL-18 rs16944 genótipo CC (77%) foram mais frequentes em relação à classificação segundo o fenótipo de gravidade "Leve/Intermediário" em indivíduos portadores de anemia falciforme, seguido de genótipo G/C (63,6%) – Tabela 15. Vale ressaltar que a frequência deste SNP e desses fenótipos, respectivamente nos indivíduos foi de 50,0% e 44,4%. O genótipo G/G teve uma frequência baixa e talvez pelo tamanho amostral não houve representação no fenótipo de gravidade.

- Polimorfismo no gene do inflamassoma NLRP3

Há no gene do NLRP3 tem aproximadamente 60 SNP's identificados e os mais prevalentes polimorfismos entre eles são rs35829419, rs10754558, rs4612666, rs4925648 e rs10925019.⁽¹⁰¹⁾ O presente estudo avalia a frequência do polimorfismos rs10754558 e rs35829419.

Um estudo de metanálise realizado por Zang e colaboradores (2015) mostrou que polimorfismo do inflamassoma NLRP3 rs35829419 C>A estava associada com o significativo aumento da suscetibilidade de múltiplas doenças humanas como hanseníase, câncer colorretal, infecção pelo HIV, artrite reumatoide, aneurisma de aorta abdominal, colite ulcerativa e dermatite atópica. ⁽¹²⁶⁾

Em nosso estudo , no que diz respeito ao polimorfismo do NLRP3 rs35829419, o genótipo CC foi o mais frequente (89,5%), enquanto que no NLRP3 rs10754558, o genótipo CC foi o mais frequente (Tabela 13). Quando analisada associações entre estes polimorfismos nos grupos de indivíduos portadores de anemia falciforme (casos) e de indivíduos sadios (controles), observa-se que não houve associação tanto pra o NLRP3 rs35829419 ($p=0,611$) quanto para o NLRP3 rs10754558 ($p=0,662$) (Tabela 14). O SNP NLRP3 rs35829419 (Q705K) genótipo CC foi mais frequente $f_i=8$ (em número absoluto) nas classificações segundo o fenótipo de gravidade nas formas leve/Intermediária, enquanto que o SNP NLRP3 rs10754558 genótipo CC foi mais frequente $f_i=6$ (em número absoluto) na mesma classificações segundo o fenótipo de gravidade nas formas leve/Intermediária. (Tabela 15)

- Polimorfismo no gene do inflamassoma NLRP1

Para definir mais precisamente, a região genômica do NLRP1 confere suscetibilidade à ao vitiligo associado à múltiplas doenças autoimunes. ⁽¹²⁷⁾

Em nosso estudo , no que diz respeito ao polimorfismo do NLRP1 rs12150220, o genótipo A/T foi o mais frequente (42,1%), enquanto que no NLRP3 rs2670660, o genótipo A/G foi o mais frequente (Tabela 13). Quando analisada associações entre estes polimorfismos nos grupos de indivíduos portadores de anemia falciforme (casos) e de indivíduos sadios (controles), observa-se que não houve associação tanto pra o NLRP1 rs12150220 ($p=0,857$) quanto para o NLRP1 rs2670660 ($p=0,587$) (Tabela 14). O NLRP1 rs12150220 genótipo A/T foi mais frequente $f_i=7$ (em número absoluto) nas classificações segundo o fenótipo de gravidade nas formas leve/Intermediária, enquanto que o SNP NLRP1 rs2670660 se distribuiu igualmente nos genótipo A/A e A/G nas classificações segundo o fenótipo de gravidade nas formas leve/Intermediária e grave. (Tabela 15)

- Associações entre os marcadores hematológicos clássicos de gravidade de anemia falciforme e os SNP's dos genes dos Inflamossomas NLRP1, NLRP3 e dos SNP's dos genes nas interleucinas IL-1 β e IL-18.

Biomarcadores são definidos como “uma característica que objetivamente medida e avaliada como um indicador um processo biológico normal ou patológico ou que farmacologicamente responde a uma terapêutica”.(128) São descritos para a anemia falciforme, biomarcadores que avaliam a hemólise (hemoglobina, contagem de reticulócitos, lactato sérico, haptoglobina), a inflamação (contagem total de leucócitos, proteína C reativa) entre outros .(128)

Com base nos dados presentes nas literaturas científicas que associam a frequência e atuação dos SNP's dos genes das IL1- β , IL-18, NLRP1 e NLRP3 frente à outras doenças de caráter imunoinflamatório e infeccioso, nossa hipótese era que na anemia falciforme poderia haver uma alteração na frequência e atuação desses SNP's frente à apresentação clínica da doença. Em nosso estudo, fizemos a associação entre os SNP's e os biomarcadores de gravidade (figuras 23 à 28). Todos os cruzamentos apresentam um $p > 0,05$ o que caracteriza não haver associação dos SNP's com os parâmetros de gravidade.

Não houve associação dos SNP's dos genes do NLRP1 e NLRP3 quando comparados com o grupo controle (tabela 14). Uma das hipóteses é que o efeito do SNP sobre a frequência só existiria em um caso bastante extremo a ponto de causar uma mortalidade intra-útero ou na infância e cuja mensuração só seria verificada e estudada em natimortos ou em material de restos ovulares e placentários, mas em indivíduos portadores da A.F. onde o impacto não chega ao ponto de causar óbito na vida adulta, ela não é observada. Em doenças adquiridas como malária, leishmaniose, hepatites virais e até mesmo o câncer onde há atuação direta do sistema imune sobre a evolução clínica, polimorfismos destes genes que influenciam na regulação para cima ou para baixo na secreção e atuação das interleucinas irá exercer mais ou menos gravidade na sua apresentação.

Por fim, não podemos também esquecer que fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme podem influenciar no resultado exibido em nossos dados. Excetuando o genótipo da doença (vez que todos os indivíduos do grupo são HB SS), os níveis de HB F e o haplótipo podem exercer efeito sobre a apresentação clínica e as

associações entre os SNP's e os fenótipos de gravidade, caso houvessem, deveriam ser discutidos com cuidado.

7- CONCLUSÕES

- Não houve associação dos polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 com indivíduos portadores de anemia falciforme em nosso grupo de estudo.
- Não houve associação entre os polimorfismos dos genes das Interleucinas IL-1 β e IL-18 e os polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 com os fenótipos de gravidades em indivíduos portadores de anemia falciforme.
- Não houve associação entre os polimorfismos dos genes das Interleucinas IL-1 β e IL-18 e os polimorfismos dos genes dos inflamossomas NLRP1 e NLRP3 com os marcadores clássicos de gravidade em indivíduos portadores de anemia falciforme.
- Os critérios de gravidade em indivíduos portadores de doença falciforme sofrem influencia de aspectos multifatoriais e esta peculiaridade da doença pode influenciar na sua apresentação clínica e dificultar o estudo de associações com polimorfismos genéticos.
- Apesar da anemia falciforme ser uma doença de caráter inflamatório crônico, só os polimorfismos de genes que influenciam na resposta imune não suficientes para alterar o curso da gravidade da apresentação clínica.

8- REFERÊNCIAS

1. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med* [Internet]. Jan [cited 2016 Mar 1];74(3):179–84. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2588723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. SYDENSTRICKER VP. FURTHER OBSERVATIONS ON SICKLE CELL ANEMIA. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. American Medical Association; 1924 Jul 5 [cited 2016 Apr 25];83(1):12. Available from:
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=230711>
3. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 Apr [cited 2015 Oct 10];117(4):850–8. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1838946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Scriver JB, Waugh TR. STUDIES ON A CASE OF SICKLE-CELL ANAEMIA. *Can Med Assoc J* [Internet]. 1930 Sep [cited 2015 Nov 22];23(3):375–80. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=382053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. PAULING L. MOLECULAR DISEASE AND EVOLUTION. *Bull N Y Acad Med* [Internet]. 1964 May [cited 2016 Mar 6];40:334–42. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1750607&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science* (80-) [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 1949 Nov 25 [cited 2016 Apr 5];110(2865):543–8. Available from:
<http://science.sciencemag.org/content/110/2865/543.abstract>
7. Neel J V. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 1949 Jul 15 [cited 2015 Aug 20];110(2846):64–6. Available from:
<http://science.sciencemag.org/content/110/2846/64.abstract>
8. Watson J, Starman AW, Bilello FP. THE SIGNIFICANCE OF THE PAUCITY OF SICKLE CELLS IN NEWBORN NEGRO INFANTS. *Am J Med Sci* [Internet]. 1948 Apr 1 [cited 2016 Apr 25];215(4):419–23. Available from:
https://www.researchgate.net/publication/5740864_Watson_J_The_significance_of_the_paucity_of_sickle_cells_in_newborn_Negro_infants_Am_J_Med_Sci_215_419-423
9. Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 1958 Jan [cited 2016 Apr 25];28:539–45. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000630025890516X>
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença Falciforme: condutas básicas para o tratamento [Internet]. 1o. Edição. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada; 2012 [cited 2017 Aug 12]. 64 p. Available from:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_condutas_basicas.pdf
11. ROCHA HHG. Anemia Falciforme. 1o. Edição. Rio de Janeiro: Rubio; 2004. p. 72.
12. Guidelines for the control of haemoglobin disorders. Report of the VIth Annual Meeting of the WHO Working Group on Haemoglobinopathies, Cagliari, Sardinia, 8–9 April, 1989. Geneva, World Health Organization, 1989 (unpublished document WHO/HDP/WG/HA/89.2).

13. Naoun PC. Origem e Dispersão do Gene bS – Hemoglobinopatias [Internet]. 2010 [cited 2017 Aug 13]. Available from: <http://hemoglobinopatias.com.br/origem-e-dispersao-do-gene-bs/>
14. Pante-de-Sousa G, Mousinho-Ribeiro R de C, Santos EJM dos, Zago MA, Guerreiro JF. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. *Genet Mol Biol* [Internet]. 1998 Dec [cited 2017 Aug 13];21(4):427–30. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47571998000400001&lng=en&tlng=en
15. Ruiz MA. Anemia Falciforme. Objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007 set; 29(3): 203-4.
16. Silva W dos S, Lastra A, Oliveira SF de, Klautau-Guimarães N, Grisolia CK. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, Brasil. *Cad Saude Publica* [Internet]. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2006 Dec [cited 2017 Aug 12];22(12):2561–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2006001200006&lng=pt&tlng=pt
17. De Oliveira D, Rodrigues W, Calil M, Ferreira B, Pereira PM, Teresa M, et al. DIAGNÓSTICO HISTÓRICO DA TRIAGEM NEONATAL PARA DOENÇA FALCIFORME Historical diagnosis about neonatal screening for sickle cell disease. 2010;13(1):34–45.
18. Ramalho AS, Jorge RN, Oliveira JÁ, Pereira DA. Hemoglobina S em recém-nascidos brasileiros. *J Pediatr*. 1976;41:9-10.
19. Ramalho AS. As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil. Ed Soc Bras Genética, 1986.
20. Doença Falciforme [Internet]. [cited 2017 Aug 12]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/955-sas-raiz/dahu-raiz/sangue-e-hemoderivados/l2-sangue-e-hemoderivados/13335-doenca-falciforme>
21. Paulo Cesar Naoum. Sickle cell disease: from the beginning until it was recognized as a public health disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 13];33(1). Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v33n1/v33n1a06.pdf>
22. Silva RB de P e, Ramalho AS, Cassorla RMS. A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. *Rev Saude Publica* [Internet]. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 1993 Feb [cited 2017 Aug 12];27(1):54–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101993000100009&lng=pt&tlng=pt
23. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* [Internet]. 2008 Nov 15 [cited 2015 Nov 12];112(10):3927–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2581994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Neto G de G, Pitombeira M da S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. 2003 [cited 2015 Nov 20]; Available from: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n1/v39n1a10.pdf>
25. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood* [Internet]. 1989 Apr [cited 2015 Nov 21];73(5):1081–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649166>
26. Claiborn K. David Weatherall wins the 2010 Lasker~Koshland Special Achievement

- Award in Medical Research for advances in thalassemia. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2010 Oct 1 [cited 2015 Nov 21];120(10):3406–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2947249/>
27. Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1998 Jun 30 [cited 2015 Nov 21];850:38–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9668525>
 28. Odièvre M-H, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian J Med Res* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Jan 24];134:532–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3237253&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 29. Ferrone FA. Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. *Microcirculation* [Internet]. 2004 Mar [cited 2016 Jan 25];11(2):115–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280087>
 30. Stuart MJ, Nagel RL, Onwubalili J, Herrick J, Pauling L, Itano H, et al. Sickle-cell disease. *Lancet* [Internet]. Elsevier; 2004 Oct [cited 2016 Jul 10];364(9442):1343–60. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673604171924>
 31. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2007 Sep [cited 2016 Jan 25];29(3):207–14. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 32. Sonati M de F, Costa FF. Genética das doenças hematólogicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. Sociedade Brasileira de Pediatria; 2008 Aug [cited 2016 Jan 24];84(4):S40–51. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572008000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 33. Schmid-Schönbein GW. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. *Angiology* [Internet]. 1993 Jan [cited 2016 Jan 27];44(1):45–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380959>
 34. Lonergan GJ, Cline DB, Abbondanzo SL. Sickle cell anemia. *Radiographics* [Internet]. [cited 2016 Jun 25];21(4):971–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452073>
 35. Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2016 Jul 10];340(13):1021–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099145>
 36. Almeida A, Roberts I. Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol* [Internet]. 2005 May [cited 2016 Jul 10];129(4):482–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15877730>
 37. Angulo IL. Acidente vascular cerebral e outras complicações do sistema nervoso central nas doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2007 Sep [cited 2016 Jun 27];29(3):262–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 38. Bruniera P. Crise de seqüestro esplênico na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2007 Sep [cited 2016 Jul 10];29(3):259–61. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt

39. Cople-Rodrigues LCLJORLMCCMAC dos S. Fisiopatologia da doença renal crônica em adultos com doença falciforme. *Rev Hosp Univ Pedro Ernesto. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*; 2015;14(3):58–63.
40. Gualandro SFM, Fonseca GHH, Gualandro DM. Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Jun 27];29(3):291–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
41. Traina F, Saad STO. Complicações hepáticas na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2007 Sep [cited 2016 Jun 27];29(3):299–303. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842007000300021&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
42. Introdução – Doença Falciforme – Hemoglobinopatias [Internet]. [cited 2017 Aug 13]. Available from: <http://hemoglobinopatias.com.br/introducao-doenca-falciforme/>
43. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1978 Nov [cited 2017 Aug 14];75(11):5631–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/281713>
44. Kan YW, Dozy AM. Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science* [Internet]. 1980 Jul 18 [cited 2017 Aug 14];209(4454):388–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7384810>
45. Lapoumeroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobé M, Bodo JM, et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet* [Internet]. 1992 May [cited 2017 Aug 14];89(3):333–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376298>
46. Sickle-Cell Anemia: A Look at Global Haplotype Distribution [Internet]. [cited 2017 Aug 14]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/sickle-cell-anemia-a-look-at-global-8756219>
47. Figueiredo MS, Silva MC, Guerreiro JF, Souza GP, Pires AC, Zago MA. The heterogeneity of the beta s cluster haplotypes in Brazil. *Gene Geogr* [Internet]. 1994 Apr [cited 2017 Aug 14];8(1):7–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619778>
48. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu β s cluster haplotype predominates among Brazilian Blacks. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 1992 Jul [cited 2017 Aug 14];88(3):295–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642317>
49. Lemos Cardoso G, Farias Guerreiro J. African gene flow to north Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. *Am J Hum Biol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2017 Aug 14];18(1):93–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajhb.20467>
50. Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JAP, Gesteira M de F, Carvalho MH, Saad STO, et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saude Publica* [Internet]. [cited 2017 Aug 14];21(4):1287–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021267>
51. Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2017 Aug 14];36(10):1283–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14502357>
52. Zago MA, Silva WA, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, et al.

- Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol* [Internet]. 2000 Feb [cited 2017 Aug 14];63(2):79–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10629573>
53. Figueiredo MS, Kerbauy J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, et al. Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol* [Internet]. 1996 Oct [cited 2017 Aug 14];53(2):72–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892730>
 54. Costa FF, Arruda VR, Gonçalves MG, Miranda SR, Carvalho MH, Sonati MF, et al. Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from two regions of Brazil. *Am J Hematol* [Internet]. 1994 Jan [cited 2017 Aug 14];45(1):96–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8250018>
 55. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* [Internet]. 2004 Oct [cited 2017 Aug 15];364(9442):1343–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474138>
 56. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, et al. The Interaction of Alpha-Thalassemia and Homozygous Sickle-Cell Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1982 Jun 17 [cited 2017 Aug 15];306(24):1441–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6176865>
 57. Lettre G. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2017 Aug 15];2(10):a015032–a015032. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a015032>
 58. Joly P, Pondarré C, Bardel C, Francina A, Martin C. The alpha-globin genotype does not influence sickle cell disease severity in a retrospective cross-validation study of the pediatric severity score. *Eur J Haematol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 Aug 15];88(1):61–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0609.2011.01705.x>
 59. Solomou E, Kraniotis P, Kourakli A, Petsas T. Extent of silent cerebral infarcts in adult sickle-cell disease patients on magnetic resonance imaging: is there a correlation with the clinical severity of disease? *Hematol Rep* [Internet]. 2013 Jan 25 [cited 2017 Aug 15];5(1):8–12. Available from: <http://www.pagepress.org/journals/index.php/hr/article/view/4495>
 60. Pearson SR, Alkon A, Treadwell M, Wolff B, Quirolo K, Boyce WT. Autonomic reactivity and clinical severity in children with sickle cell disease. *Clin Auton Res* [Internet]. 2005 Dec [cited 2017 Aug 15];15(6):400–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10286-005-0300-9>
 61. Joly P, Pondarré C, Bardel C, Francina A, Martin C. The alpha-globin genotype does not influence sickle cell disease severity in a retrospective cross-validation study of the pediatric severity score. *Eur J Haematol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 Aug 15];88(1):61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910753>
 62. Cameron BF, Christian E, Lobel JS, Gaston MH. Evaluation of clinical severity in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc* [Internet]. 1983 May [cited 2017 Aug 15];75(5):483–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6864827>
 63. van den Tweel XW, van der Lee JH, Heijboer H, Peters M, Fijnvandraat K. Development and validation of a pediatric severity index for sickle cell patients. *Am J Hematol* [Internet]. 2010 Aug 30 [cited 2017 Aug 15];85(10):746–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806231>
 64. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood* [Internet].

- 2007 Oct 1 [cited 2017 Aug 15];110(7):2727–35. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-04-084921>
65. Belini Junior E, Silva DGH, Torres L de S, Okumura JV, Lobo CL de C, Bonini-Domingos CR. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells Mol Dis* [Internet]. 2015 Apr [cited 2017 Aug 15];54(4):321–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979615000315>
 66. Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Mar 13];5:115. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4035012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 67. Lyoumi S, Puy H, Tamion F, Bogard C, Leplingard A, Scotté M, et al. Heme and acute inflammation role in vivo of heme in the hepatic expression of positive acute-phase reactants in rats. *Eur J Biochem* [Internet]. 1999 Apr [cited 2016 Jul 1];261(1):190–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103050>
 68. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 1997 Dec [cited 2016 Jul 2];216(3):456–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9402154>
 69. Graça-Souza A V, Arruda MAB, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* [Internet]. 2002 Jun 1 [cited 2016 Jul 2];99(11):4160–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010821>
 70. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2014 Jun 12 [cited 2016 Jul 2];123(24):3818–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620350>
 71. Natarajan R, Fisher BJ, Fowler AA. Hypoxia inducible factor-1 modulates heme-induced IL-8 secretion in microvascular endothelium. *Microvasc Res*. 2007;73(3):163–72.
 72. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2016 Jul 2];210(7):1283–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825232>
 73. Arruda MA, Rossi AG, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza A V. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2016 Jul 2];173(3):2023–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265937>
 74. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Jul 13 [cited 2016 Jul 2];282(28):20221–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502383>
 75. Chen M, Wang H, Chen W, Meng G. Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2011 May [cited 2015 Jun 30];11(5):549–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576910003899>
 76. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2014 Jul 10];140(6):805–20. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410000231>
 77. Sutterwala FS, Ogura Y, Flavell RA. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2016 Jul 2];82(2):259–64.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470531>
78. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2014 Jul 10];140(6):805–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872>
 79. Shi Z, Cai Z, Sanchez A, Zhang T, Wen S, Wang J, et al. A Novel Toll-like Receptor That Recognizes Vesicular Stomatitis Virus. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Feb 11 [cited 2017 Aug 23];286(6):4517–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131352>
 80. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* [Internet]. 2015 Jun 29 [cited 2015 Jun 30];21(7):677–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26121197>
 81. Schwartz RS, Netea MG, Van Der Meer JWM. Mechanisms of Disease Immunodeficiency and Genetic Defects of Pattern-Recognition Receptors. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 [cited 2017 Sep 7];364:60–70. Available from: http://www.iki.uniklinikum-jena.de/iki_media/Downloads/Netea+nejmra2011.pdf
 82. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* [Internet]. 2001 Sep 15 [cited 2016 Jul 2];98(6):1802–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535514>
 83. Gladwin MT, Ofori-Acquah SF. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood* [Internet]. 2014 Jun 12 [cited 2016 Feb 28];123(24):3689–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4055918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 84. Davis BK, Wen H, Ting JP-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2016 Jul 2];29:707–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219188>
 85. Miao EA, Rajan J V, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Sep [cited 2016 Jul 2];243(1):206–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884178>
 86. Lamkanfi M, Vande Walle L, Kanneganti T-D. Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Sep [cited 2016 Jul 2];243(1):163–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884175>
 87. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti T-D. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med* [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 Mar 30];17(2):57–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3057120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 88. Yang C-S, Shin D-M, Jo E-K. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. *Int Neurourol J* [Internet]. 2012 Mar [cited 2016 Feb 23];16(1):2–12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 89. Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Nlrp3: An immune sensor of cellular stress and infection. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(6):792–5.
 90. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood* [Internet]. 2014 Jan 16 [cited 2016 Jul 3];123(3):377–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24277079>
 91. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* [Internet]. 2002 Aug [cited 2017 Sep 11];10(2):417–26. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191486>
92. Dowling JK, O'Neill LAJ. Biochemical regulation of the inflammasome. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2015 Jun 30];47(5):424–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681257>
 93. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome Components NALP 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-specific Role in the Inflammatory Response. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2007 [cited 2017 Sep 11];55:443–52. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1369/jhc.6A7101.2006>
 94. Faustin B, Lartigue L, Bruet J-M, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* [Internet]. 2007 Mar 9 [cited 2017 Sep 11];25(5):713–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276507000780>
 95. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Feb 22 [cited 2017 Sep 11];38(2):240–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429160>
 96. Petrilli V, Papin S, Tschopp J, Nunez G. The inflammasome. *Curr Biol* [Internet]. Elsevier; 2005 Aug 9 [cited 2017 Sep 11];15(15):R581. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085473>
 97. Verma D, Lerm M, Blomgran Julinder R, Eriksson P, Söderkvist P, Särndahl E. Gene polymorphisms in the NALP3 inflammasome are associated with interleukin-1 production and severe inflammation: relation to common inflammatory diseases? *Arthritis Rheum* [Internet]. 2008 Mar [cited 2016 Feb 23];58(3):888–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311798>
 98. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* [Internet]. 2001 Nov [cited 2016 Apr 3];29(3):301–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4322000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 99. Mathews RJ, Sprakes MB, McDermott MF. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis Res Ther* [Internet]. BioMed Central; 2008 [cited 2017 Sep 10];10(6):228. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19090963>
 100. Pontillo A, Oshiro TM, Girardelli M, Kamada AJ, Crovella S, Duarte AJS. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2016 Jul 4];59(2):121–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227487>
 101. Verma D, Särndahl E, Andersson H, Eriksson P, Fredrikson M, Jönsson J-I, et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 β and IL-18 production. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Feb 22];7(4):e34977. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3328489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 102. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014 Oct 16 [cited 2015 Oct 18];6(12):a016287–a016287. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324215>
 103. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2013 Feb 19 [cited 2017 Sep 12];110(8):2952–6.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382179>
104. Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Jul 11];11(3):332–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25984581>
 105. Singh PK, Ahmad MK, Kumar V, Hussain SR, Gupta R, Jain A, et al. Effects of interleukin-18 promoter (C607A and G137C) gene polymorphisms and their association with oral squamous cell carcinoma (OSCC) in northern India. *Tumour Biol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2016 Jul 11];35(12):12275–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25398690>
 106. Tian M, Deng YY, Hou DR, Li W, Feng XL, Yu ZL. Association of IL-1, IL-18, and IL-33 gene polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease in a Hunan Han Chinese population. *Brain Res* [Internet]. Elsevier; 2015 Jan [cited 2016 Jul 11];1596:136–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899314015662>
 107. Folwaczny M, Glas J, Török H-P, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, et al. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2005 May [cited 2016 Jul 11];32(5):530–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15842270>
 108. Koziel MJ. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis* [Internet]. 1999 [cited 2016 Jul 11];19(2):157–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10422198>
 109. Ferreira S da C, Chachá SGF, Souza FF, Teixeira AC, Santana R de C, Deghaide NHS, et al. IL-18, TNF, and IFN- γ alleles and genotypes are associated with susceptibility to chronic hepatitis B infection and severity of liver injury. *J Med Virol* [Internet]. 2015 Oct [cited 2016 Jul 11];87(10):1689–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25952099>
 110. Bayley J-P, Ottenhoff THM, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun* [Internet]. 2004 Aug [cited 2016 Jul 11];5(5):315–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973548>
 111. Santos MLS, Reis EC, Bricher PN, Sousa TN, Brito CFA, Lacerda MVG, et al. Contribution of inflammasome genetics in *Plasmodium vivax* malaria. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier; 2016 Jun [cited 2016 Jul 11];40:162–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134816300697>
 112. Zhang W-H, Wang X-L, Zhou J, An L-Z, Xie X-D. Association of interleukin-1B (IL-1B) gene polymorphisms with risk of gastric cancer in Chinese population. *Cytokine*. 2005;30(6):378–81.
 113. Qian N, Chen X, Han S, Qiang F, Jin G, Zhou X, et al. Circulating IL-1beta levels, polymorphisms of IL-1B, and risk of cervical cancer in Chinese women. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2010 May [cited 2016 Jul 11];136(5):709–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19904560>
 114. Griffin WST, Liu L, Li Y, Mrak RE, Barger SW. Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. *J Neuroinflammation* [Internet]. BioMed Central; 2006 [cited 2016 Jul 11];3(1):5. Available from: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-3-5>
 115. Karra VK, Gumma PK, Chowdhury SJ, Ruttala R, Polipalli SK, Chakravarti A, et al. IL-18 polymorphisms in hepatitis B virus related liver disease. *Cytokine*. 2015;73(2):277–82.
 116. Tsai H-T, Hsin C-H, Hsieh Y-H, Tang C-H, Yang S-F, Lin C-W, et al. Impact of interleukin-18 polymorphisms -607A/C and -137G/C on oral cancer occurrence and clinical progression. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2016 Jul 11];8(12):e83572. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24349532>

117. Vicari P, Adegoke SA, Mazzotti DR, Cançado RD, Nogutti MAE, Figueiredo MS. Interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis* [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Sep 14];54(3):244–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079979614001600>
118. Cesar P. Caracterização Clínica e Demográfica de Doentes com Doença Falciforme Acompanhados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM. Diss apresentada ao Programa Pós- Grad em Ciências Apl à Hematol da Univ do Estado do Amaz como requisito para a obtenção do Tit Mestre em Ciências Apl a Hematol. 2017;
119. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. Resolução no 196 do Conselho Nacional de Saúde, 1996. [cited 2017 Sep 17]; Available from: <http://www.uricer.edu.br/cep/arquivos/informativos/normas.pdf>
120. Vilas-Boas W, Antônio B, Cerqueira V, Pitanga TN, Oliveira Seixas M, Menezes J, et al. Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation. *Adv Biosci Biotechnol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Sep 14];3:538–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2012.324071>
121. Pitanga TN, Vilas-Boas W, Cerqueira BAV, Seixas MO, Barbosa CG, Adorno EV, et al. Cytokine profiles in sickle cell anemia: Pathways to be unraveled. *Adv Biosci Biotechnol* [Internet]. Scientific Research Publishing; 2013 [cited 2017 Sep 14];4(7):6–12. Available from: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/abb.2013.47A1002>
122. Chi DZ, Chen J, Huang DP. Influence of interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms on the development of acute pancreatitis. *Genet Mol Res* [Internet]. 2015 Feb 3 [cited 2017 Sep 14];14(1):975–80. Available from: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2015/vol14-1/pdf/gmr4700.pdf>
123. El-Omar EM, Carrington M, Chow W-H, McColl KEL, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* [Internet]. 2000 Mar 23 [cited 2017 Sep 14];404(6776):398–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746728>
124. Sortica VA, Cunha MG, Ohnishi MDO, Souza JM, Ribeiro-Dos-Santos AKC, Santos NPC, et al. IL1B, IL4R, IL12RB1 and TNF gene polymorphisms are associated with Plasmodium vivax malaria in Brazil. *Malar J* [Internet]. 2012 Dec 7 [cited 2017 Sep 14];11(1):409. Available from: <http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-11-409>
125. Santos KN dos, Almeida MKC de, Fecury AA, Costa CA da, Martins LC. ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN THE INTERLEUKIN 18 GENE PROMOTOR (-137 G/C AND -607 C/A) IN PATIENTS INFECTED WITH HEPATITIS C VIRUS FROM THE BRAZILIAN AMAZON. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Sep 14];52(3):222–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032015000300222&lng=en&tlng=en
126. Zhang Q, Fan HW, Zhang JZ, Wang YM, Xing HJ. NLRP3 rs35829419 polymorphism is associated with increased susceptibility to multiple diseases in humans. *Genet Mol Res* [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Apr 3];14(4):13968–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26535712>
127. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Mar 22 [cited 2017 Sep 14];356(12):1216–25. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa061592>

128. Damanhoury GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sickle cell disease. Saudi J Biol Sci [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 Feb 29];22(1):24–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4281636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**
Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE**TÍTULO DO ESTUDO: Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis associados a Diferentes Hapótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme.**

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Gerar informações sobre o perfil fenotípico funcional de leucócitos circulantes, citocinas e quimiocinas e polimorfismos do receptor NLRP3 para a determinação de um biomarcador preditor de mudanças na intervenção clínica de pacientes com anemia falciforme.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 12 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar o perfil de células sanguíneas, citocinas, quimiocinas e genotipagem. Todos esses testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o senhor (a), mas poderá contribuir para mudanças positivas na intervenção clínica de pacientes com anemia falciforme.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: O senhor (a) terá, sempre que necessário, orientação, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial pela equipe médica da FHEMOAM, no que diz respeito à anemia falciforme, podendo entrar em contato com a doutoranda Nadja Garcia (HEMOAM:3655-0231/Tel: 92-98127-1539). Também serão feitos pela equipe médica do HEMOAM os encaminhamentos necessários de acordo com o local onde o doador residir.

VOLUNTARIEDADE: A sua participação neste estudo é voluntária, podendo ser retirada a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

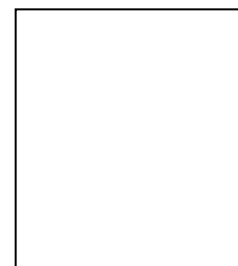
USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos posteriores. Garantimos que toda nova

pesquisa a ser realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

O Sr. (a) autoriza que o seu sangue seja guardado para futuras pesquisas imunogenéticas na anemia falciforme? () Sim ou () Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.



(Assinatura do participante)
dactiloscópica)

(Impressão

(Assinatura do pesquisador)

Manaus, ___/___/___.

APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL

Nº Registro: _____

Data: ____/____/____

QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:

Projeto: "Potenciais Biomarcadores Celulares e Solúveis associados a Diferentes Hapótipos e Fenótipos de Anemia Falciforme"

Nome: _____

Sexo: (M) (F) Data de Nascimento: _____ Idade: _____ anos

Local de Nascimento: _____ UF: _____

Cor de Pele: Branco () Moreno () Negro () Escolaridade: _____

Trabalha: _____ Profissão: _____

Estado Civil: Solteiro () Amigado () Casado () Divorciado () Separado () Viúvo ()
a quanto tempo () Possuem Filhos: Sim () Não () Quantos: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Município: _____ UF: _____ Tipo de Moradia: _____

Quantas pessoas residem: _____ Poço: Sim () Não () Esgoto: (Tipo) _____

Tipo Sanguíneo O () A () AB () B () Rh: + () - ()	Transfusões Sanguíneas Sim () Não () Quantas _____ Data da última transfusão: _____	Faz uso de Medicamento Sim () Não () Qual (ais)? _____ _____ Quanto tempo faz uso desses medicamentos? _____ _____
	Reação Transfusional Sim () Não () Quantas vezes? _____	

Outra Doença Hematológica	Doença de Chagas	Alcoolismo	Vacinação em dia? () Sim () Não () Não sabe
---------------------------	------------------	------------	---

Sim () Não () Qual (ais)? <hr/> <hr/>	Sim () Não () Dengue Sim () Não () Quantas _____ Leishmaniose Sim () Não () LTA () LV () Outras doenças infecciosas? () Sim () Não Qual (ais)? <hr/> <hr/>	Sim () Não () Quant. Dia _____ Fumante Sim () Não () Quant. Temp. _____ Quant. Dia _____ Outras Drogas Sim () Não () Tipo _____ Quant. Temp. _____	Vacina para gripe nos últimos 2 anos? () Sim () Não () Não sabe Profilaxia com penicilina até os 5 anos? () Sim () Não () Não sabe
Outras Comorbidades? Sim () Não () Qual (ais)? <hr/> <hr/>			

Febre: Sim () Não ()

Crise Vaso-Oclusiva: Sim () Não ()

Dor: Sim () Não ()

Icterícia: Sim () Não ()

Úlceras na perna: Sim () Não ()

Infecção: Sim () Não ()

Síndrome Torácica aguda: Sim () Não ()

Hipertensão Pulmonar: Sim () Não ()

Dor de Cabeça: Sim () Não ()

Sudorese: Sim () Não ()

Fraqueza: Sim: () Não ()

Priapismo: Sim: () Não ()

Colelitíase: Sim: () Não ()

Sequestro esplênico: Sim: () Não ()

Osteonecrose de cabeça de fêmur: Sim: () Não ()

Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) () Positivo () Negativo
Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI)
 Não se Aplica

- | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Anti-D | <input type="checkbox"/> Anti-C | <input type="checkbox"/> Anti-c | <input type="checkbox"/> Anti-E | <input type="checkbox"/> Anti-e | <input type="checkbox"/> Anti-C ^w | <input type="checkbox"/> Anti-G |
| <input type="checkbox"/> Anti-K | <input type="checkbox"/> Anti-Jk ^a | <input type="checkbox"/> Anti-Jk ^b | <input type="checkbox"/> Anti-Fy ^a | <input type="checkbox"/> Anti-Fy ^b | <input type="checkbox"/> Anti-P ₁ | <input type="checkbox"/> Anti-Le ^a |
| <input type="checkbox"/> Anti-Le ^b | <input type="checkbox"/> Anti-M | <input type="checkbox"/> Anti-N | <input type="checkbox"/> Anti-S | <input type="checkbox"/> Anti-s | <input type="checkbox"/> Anti-Di ^a | <input type="checkbox"/> Outros |

Fenotipagem eritrocitária Rh e K

 Fenótipo : C c (pequeno) E e (pequeno) K

 NE

 Encaminha para centro de referência

Exames laboratoriais

* Registrar o mais recente, exceto quando especificado ao contrário.

 * Registrar apenas exames colhidos em período estável, idealmente \pm 3 meses de internação ou crise aguda.

Nome	Resultado	Data
Hemoglobina (g/dL)		
Hematocrito (%)		
Plaquetas (/mm ³)		
Leucócitos (/mm ³)		
Neutrófilos (/mm ³)		
Reticulócitos (k/uL)		
Hemoglobina fetal (%)		
Ureia		
Creatinina		
Ferro serico (ug/dl)		
Ferritina		
Transferina (ug/dl)		
DHL (U/L)		
Bilirrubina total/indireta		
ALT (U/L)		
AST (U/L)		
K +		
NA +		