

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

Luana Priscilla Laranjeira Prado

**Influência de polimorfismos dos genes *SMAD7* e *SMURF1*
na ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com
anemia falciforme**

**Recife
2016**

Luana Priscilla Laranjeira Prado

**Influência de polimorfismos dos genes *SMAD7* e *SMURF1*
na ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com
anemia falciforme**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Prado, Luana Priscilla Laranjeira

Influência de polimorfismos dos genes *SMAD7* e *SMURF1* na ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme/ Luana Priscilla Laranjeira Prado– Recife: O Autor, 2016.

89 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências, anexos e apêndice

1. Polimorfismo (genética) 2. Anemia falciforme 3. Úlceras I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador) II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (coorientador) III. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-211

Luana Priscilla Laranjeira Prado

**Influência de polimorfismos dos genes *SMAD7* e *SMURF1*
na ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com
anemia falciforme**

Aprovado em 15 / 03 / 2016

Banca Examinadora:

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

**Dr. Kleber Yotsumoto Fertrin
Universidade Estadual de Campinas**

**Dr. Aderson da Silva Araújo
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco**

**Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco**

Recife

2016

Agradecimentos

A Deus “que é a inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas”. Obrigada por me dar sabedoria e guiar meus caminhos.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Ana Patrícia, que tanto lutaram para que eu chegasse até aqui, e continuam me impulsionando para sempre alcançar mais alto. A minha irmã Raysa, de quem me orgulho muito e sempre estaremos juntas na realização dos nossos sonhos. As minhas sogras, Rosa, Lourdes e Eunice, que sempre estiveram juntas me auxiliando quando precisei e que vibram com cada conquista minha.

Ao meu grande marido Bruno, amor, amigo e companheiro de todas as horas. Lutamos e crescemos juntos nestes tantos anos que se passaram e passarão nas nossas vidas. Minhas conquistas também são suas. Obrigada pela compreensão nos momentos difíceis, e pelos abraços nos horas de alegrias. Você é meu maior orgulho, e minha admiração será eterna. Te amo.

Aos amigos do LABCEN da UFPE, e aos orientadores e amigos de pesquisa do Laboratório de Hemoglobinopatias/HEMOPE/UFPE, Marcos André, Antonio Roberto e Betânia Lucena, que sempre me orientaram com sabedoria e paciência. Obrigada pelos conselhos que tanto contribuíram para a construção do meu ser profissional. Um agradecimento especial ao Dr. Aderson Araújo que sempre se mostrou solícito nos esclarecimentos de dúvidas clínicas e pelo belo profissional que é, buscando sempre fornecer o melhor contato com os pacientes.

“Na vida não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós.”
Chico Xavier

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a
eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

Albert Einstein

Resumo

As úlceras maleolares (UMs) são manifestações cutâneas frequentes na anemia falciforme (AF). Cursam com alta taxa de recorrência, retardo na cicatrização e maior probabilidade de tornarem-se crônicas. Os mecanismos desencadeantes envolvem episódios hemolíticos e vaso-oclusivos, e mais recentemente, foram apontados polimorfismos em genes regulatórios da via do TGF- β como contribuintes deste processo. Polimorfismos nos genes que regulam esta via mostram-se alvos moleculares promissores na elucidação da fisiopatologia das UMs. Com isso, nosso objetivo foi investigar a relação de polimorfismos nos genes *SMAD7* e *SMURF1* na ocorrência de UMs em pacientes com AF. O estudo foi realizado em duas coortes independentes, composta por 331 pacientes de Pernambuco (131 com UM e 200 sem UM) e 197 pacientes do estado do Rio de Janeiro (108 com UM e 89 sem UM). As genotipagens dos polimorfismos *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825) foram realizadas por PCR em tempo real. Empregando o modelo de análise recessivo, foi encontrada associação entre os homozigotos variantes (TT; GG) e a maior ocorrência de UM nos pacientes das duas coortes avaliadas, para *SMAD7* e *SMURF1* em Pernambuco ($P=0.001$ e $P=0.050$) e Rio de Janeiro ($P=0.029$ e $P=0.006$). Ademais, avaliando a coorte de Pernambuco os pacientes com genótipo TT apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento das UMs (70%) em relação aos com genótipos CC + CT (45%) ($P<0,0001$) para a *SMAD7*, e os pacientes com genótipo GG para *SMURF1* apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento das UMs (65%) em relação aos genótipos CC+CG (46%) ($P=0.009$). Sumariamente, nossos resultados mostram que os polimorfismos estudados estão envolvidos na ocorrência das UMs nas coortes de pacientes com anemia falciforme, mostrando-se como potenciais moduladores fenotípicos na doença falciforme.

Palavras-chave: Anemia Falciforme; Úlceras maleolares; Polimorfismos; TGF- β .

Abstract

Leg ulcers are one of the most common clinical manifestations of sickle cell anemia (SCA). They present a high rate of reoccurrence, delayed wound healing and a higher probability of becoming chronic. The triggering mechanisms involve hemolytic and vaso-occlusive episodes, and polymorphisms in regulatory genes of the TGF- β pathway were identified recently as contributors of this process. Polymorphisms in genes that regulate this pathway are considered as promising molecular targets in the elucidation of the pathophysiology of leg ulcers. Therefore, our aim was to investigate the relationship of the polymorphisms in *SMAD7* and *SMURF1* genes with the occurrence of leg ulcers in patients with SCA. The study was conducted in two independent cohorts consisting of 331 patients from Pernambuco (131 with leg ulcer and 200 without leg ulcer) and 197 patients from Rio de Janeiro (108 with leg ulcer and 89 without leg ulcer). The genotyping of *SMAD7* C>T (rs736839) and *SMURF1* C>G (rs219825) were performed by real time PCR. Using the recessive model of analysis, we found an association between homozygous variants (CC; GG) and the higher incidence of leg ulcers in patients from the two evaluated cohorts for *SMAD7* and *SMURF1* in Pernambuco ($P = 0.001$ and $P = 0.050$) and Rio de Janeiro ($P = 0.029$ and $P = 0.006$). Moreover, assessing the cohort of Pernambuco, patients with CC genotype had a higher rate of leg ulcers development (70%), compared to those with CC + CT genotypes (45%) ($P < 0.0001$) for *SMAD7*, and patients with GG genotype for *SMURF1* showed a higher rate of development of leg ulcers (65%) compared to CC + CG genotype (46%) ($P = 0.009$). In summary, our results demonstrated that the studied polymorphisms are involved in the occurrence of leg ulcers in cohorts of patients with sickle cell anemia, showing up as potential phenotypic modulators of sickle cell disease.

Key words: Sickle cell anemia, Leg ulcers, Polymorphisms, TGF- β .

Lista de Ilustrações

- Figura 1** - Padrões de distribuição dos haplótipos β^S na África e em alguns estados do Brasil. As setas indicam os locais de origem e destino..... 19
- Figura 2** - Alteração estrutural de eritrócitos com hemoglobina S. A desoxigenação da Hb S induz uma alteração conformacional, na qual há formação de polímeros que perturbam o citoesqueleto dando origem à característica de hemácia em foice. A interrupção da ligação da membrana com o citoesqueleto resulta na exposição de epítomos de proteínas transmembranar, e na composição de fosfatidilserina (FS) entre o interior e o exterior da célula.22
- Figura 3** – O papel da hemólise na disfunção vascular na anemia falciforme. Este modelo descreve algumas das vias ativadas em doença falciforme, incluindo hemólise intravascular e o consumo de NO pela hemoglobina extracelular. (A) Hemoglobina livre no plasma inativa NO, gerando metemoglobina e nitrato inerte. (B) Arginase no plasma consome L-arginina e converte em ornitina, esgotando a sua disponibilidade para a produção de NO. (C) LDH também liberado da hemácia serve como um marcador para a magnitude da hemólise e liberação da arginase. NO também é consumida por espécies reativas de oxigênio, originadas pelos altos níveis de atividade da xantina oxidase e atividade da NADPH oxidase observada na doença falciforme. Como resultado final, há diminuição da biodisponibilidade do NO contribuindo com a vasoconstrição, culminando dos eventos patológicos, como priapismo, hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral e úlceras de perna. ...24
- Figura 4** – Imagens de úlceras maleolares de pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope em 2013.....27
- Figura 5** – Representação esquemática das firefentes formas estruturais do TGF- β durante a síntese, secreção e ativação.31
- Figura 6** – Desenho esquemático ilustrando a via de sinalização do TGF- β . Transdução de sinal superfamília TGF- β /BMP. Ligantes do TGF- β , se ligam a receptores do tipo II, que, em seguida recrutam os receptores do tipo I levando a transfosforilação de receptores tipo I. Receptor tipo I ativado fosforila RSmad 2/3, que, em seguida, com o complexo de Smad4, translocam-se para o núcleo onde irão se ligar a regiões específicas no DNA, co-estimuladores ou co-repressores de genes alvo. Esta via é inibida pela I-Smad7 no núcleo, e SMURF1 no citoplasma.33
- Figura 7** – Domínios estruturais das SMADs. Os domínios MH1 da SMAD2 possui uma sequência adicional de 30 aminoácidos, conferindo 66% de homologia com SMAD3. Esta por sua vez, contém na porção *Liker* uma região de trans-ativação (TA) de ligação com MAPK. Enquanto que a SMAD4, apresenta na porção *Liker* um ponto de sinalização de exportação do núcleo. Comumente, as SMADs possuem *NLS* um sinalizador nuclear, com função de importar o complexo para o núcleo da célula. Em contra-partida, a I-SMAD7, apresenta apenas o domínio MH2, como sendo controlador da fosforilação.34
- Figura 8** – Representação esquemática da proteína inibitória SMURF1.36
- Figura 9** – Funções do TGF- β na cicatrização de lesões teciduais.....38

Figura 10 – Fluxograma de atividades realizadas em estudos GWAS. O fenótipo apresentado é apenas um exemplo de patologia que abordamos no nosso estudo. 41

Figura 11 – SNPs em genes pertencentes das vias da inflamação, do metabolismo ósseo e cicatrização, associados com algumas manifestações clínicas da anemia falciforme. 42

Figura 12 – Probabilidade de surgimento das úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme no estado de Pernambuco, de acordo com o polimorfismo *SMAD7* C>T (rs736839)..... 61

Figura 13 – Probabilidade de surgimento das úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme no estado de Pernambuco, de acordo com o polimorfismo *SMURF1* C>G (rs219825). 62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com anemia falciforme de acordo com a ocorrência de úlcera maleolar do estado de Pernambuco. 54

Tabela 2 – Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com anemia falciforme de acordo com a ocorrência de úlcera maleolar do estado do Rio de Janeiro..... 56

Tabela 3 – Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825), de acordo com a ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme dos estados de Pernambuco e do Rio de Janeiro..... 60

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
A	Adenina
ATP	Atípico
ARB	Árabe-indiano
C	Citosina
CAM	Camarões
CAR	República Central Africana
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
G	Guanina
kDa	KiloDalton
K ⁺	Íon Potássio
Na ⁺	Íon Sódio
SMAD	Derivado de uma definição homóloga do gene Mad em drosófilas
SMURF	Do inglês, <i>SMAD ubiquination regulatory factors</i>
SEN	Senegal
pb	Pares de Base
p	Braço Curto do Cromossomo
q	Braço Longo do Cromossomo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T	Timina
U	Unidades
µL	Micro Litros
µM	Micro Mol

mM

Mili Mol

ng

Nano Gramas

x

Veze

°C

Graus Celsius

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão da Literatura	16
2.1 Anemia Falciforme.....	16
2.1.1 Etiologia e epidemiologia	16
2.1.2 Modulação genética da diversidade fenotípica	17
2.1.3 Fisiopatologia e as manifestações clínicas	21
2.2 Úlceras Maleolares.....	25
2.3 Fator Transformador do Crescimento (TGF- β)	29
2.3.1 Ativação do TGF- β	30
2.3.2 Via de Sinalização do TGF- β	31
2.3.3 Regulação negativa da via de sinalização do TGF- β	34
2.3.4 Papel biológico do TGF- β	36
2.4 Polimorfismos genéticos no estudo das úlceras maleolares na anemia falciforme.....	39
3. Objetivos.....	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4. Material e Métodos.....	46
4.1 Casuística.....	46
4.2 Análises laboratoriais.....	47
4.3 Aspectos Éticos da Pesquisa.....	48
4.4 Estudo molecular	48
4.4.1 Extração de DNA genômico.....	48
4.4.2 Caracterização dos pacientes quanto aos marcadores moleculares clássicos da AF	50
4.4.3 Análise Molecular dos Polimorfismos.....	50
4.4.4 Análises Estatísticas	52
5. Resultados	53
5.1 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes	53
5.2 Perfil alélico e genotípico dos polimorfismos nos genes <i>SMAD7</i> e <i>SMURF1</i> e a relação com ocorrência das úlceras maleolares	57
6. Discussão	63
8. Referências Bibliográficas.....	70
9. Anexos.....	78

ANEXO A — Parecer Substanciado Do Comitê De Ética Em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CCS-UFPE.....	78
10. Currículo Lattes.....	80
APÊNDICE A — TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIORES DE 18 ANOS (resolução 466/12)	87

1. Introdução

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia autossômica recessiva de distribuição mundial, resultante de uma mutação pontual no gene da globina beta. Essa mutação é suficiente para modificar a síntese da hemoglobina A normal (HbA), para a síntese de uma hemoglobina anormal, conhecida como hemoglobina S (HbS). Em condições de estresse, como diminuição do pH e da biodisponibilidade de oxigênio, desidratação e baixos níveis da Hb fetal (HbF), a HbS polimeriza. Decorrente deste fenômeno, as hemácias tornam-se rígidas e susceptíveis a hemólise, culminando nos eventos vaso-oclusivos e crises hemolíticas frequentes nos pacientes com AF.

Por oclusão dos vasos sanguíneos, as células falcizadas causam lesão vascular, seguida de inflamação local e ativação das células endoteliais. A gravidade destes processos varia entre os pacientes, e sua complexidade inclui a coexistência com alfa talassemia, os haplótipos ligados ao *cluster* da globina β^S e a concentração da hemoglobina fetal (HbF).

Algumas das complicações clínicas comprometem consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. Dentre elas, estão as úlceras de membros inferiores ou úlceras maleolares (UM). Desenvolvem-se em áreas com redução do tecido subcutâneo, pele fina, e com diminuição do fluxo sanguíneo. As regiões mais afetadas são as porções de maléolo medial e lateral (tornozelos), muitas vezes tornando-se circunferencial se não for controlada precocemente.

A variabilidade na ocorrência das UM, pode sofrer influência do meio ambiente, das condições sociais e por diferenças genéticas. O curso patológico segue paralelamente com os fenômenos crônicos de hemólise intravascular. O aparecimento das lesões, por muitas vezes decorre de traumas ou de forma espontânea. A lesão

ainda pode ser agravada pela colonização de bactérias, e em alguns casos, pequenos procedimentos cirúrgicos podem retardar o processo de cicatrização. O desenvolvimento de um mecanismo reparador tecidual pós-traumático envolve citocinas fundamentais para alcançar a cicatrização. Neste contexto, destaca-se o papel da via do fator transformador do crescimento do tipo beta (TGF- β).

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica com atuação importante na regulação do processo de cicatrização, reepitelização, inflamação local e formação de granulação do tecido. O mecanismo para estimulação dessas funções depende da interação do TGF- β com seus respectivos receptores localizados na superfície celular. O sinal emitido desencadeará a ativação de diferentes vias de sinalizações intracelulares, ativando genes inflamatórios e reparadores. Proteínas SMADs e SMURFs estão estritamente interligadas na regulação das funções do TGF- β , exercendo um feedback positivo e negativo que servirão de controle na expressão dos genes envolvidos no microambiente celular.

Entretanto, é necessária que toda a via de sinalização do TGF- β atue de forma equilibrada. Polimorfismos de um único nucleotídeo (do inglês, *single nucleotide polymorphisms* - SNPs) que desregulam a função das proteínas integradoras da via, vêm sendo estudados com a finalidade de elucidar motivos desconhecidos do agravamento e surgimento espontâneo das úlceras.

A via de ativação do TGF- β parece exercer um papel fundamental na cicatrização das úlceras em pacientes falciformes. Portanto, investigar o papel de SNPs nos genes *SMADs* e *SMURFs* pode nos fornecer caminhos para esclarecer mecanismos fisiopatológicos das UM. Estudos de associação são necessários para a compreensão da variabilidade genética nesta doença.

2. Revisão da Literatura

2.1 Anemia Falciforme

2.1.1 Etiologia e epidemiologia

A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia decorrente de uma mutação pontual, na qual ocorre a substituição de uma adenina por timina (GAG →GTG) na 6ª posição do gene da β -globina localizado no cromossomo 11p15.15. Por conseguinte, ocorre a troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina levando à formação de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (HbS) (Frenette & Atweh, 2007; Steinberg & Sebastiani, 2012).

Segundo dados do Ministério da Saúde no Brasil, a prevalência estimada da AF é de 25.000 a 30.000 casos, com incidência de 3.500 novos casos por ano, ocorrendo predominantemente, entre afro-descendentes (Brasil, 2012; Soares et al., 2014). No Brasil, estima-se que 5-6% da população brasileira, seja portadora do alelo β^s e que, a cada ano, nascem entre 700-1000 crianças portadoras da AF (Lyra et al., 2005; Cançado & Jesus, 2007).

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

De acordo com dados do Ministério da Saúde, estima-se o nascimento de uma criança com AF para cada mil recém-nascidos vivos (Cançado & Jesus, 2007). No Rio de Janeiro, por exemplo, há estimativa de 4% de portadores assintomáticos da HbS na população e o nascimento de uma criança com doença falciforme (DF) a cada

1.200 nascimentos, o que equivale a existência de mais de 13 mil indivíduos com DF no Estado (Cançado & Jesus, 2007). No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 1.400 (1:1400) nasce com a doença falciforme (Soares et al, 2014).

2.1.2 Modulação genética da diversidade fenotípica

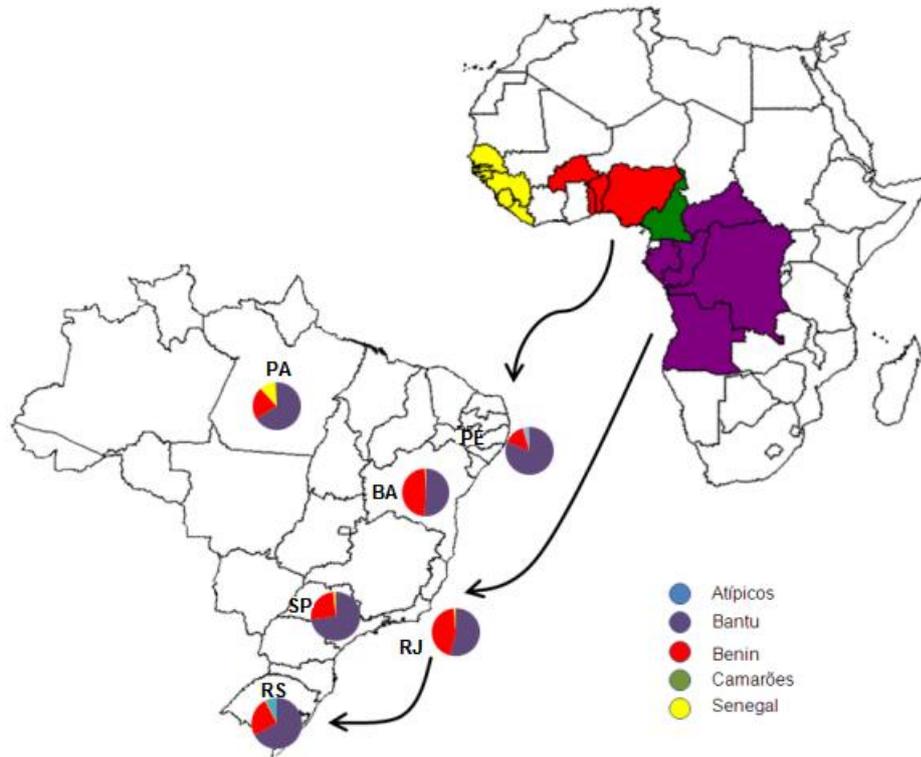
Embora a AF resulte da homozigose para HbS, fenotipicamente, essa doença apresenta-se de forma heterogênea, de modo que, diferentes pacientes podem apresentar evoluções clínicas significativamente distintas. Isso se deve ao fato da influência de moduladores genéticos que proporcionam quadros clínicos variantes. Dois principais moduladores já bem estabelecidos são os haplótipos β^S e a co-herança com a talassemia alfa (α) (Lapouniéroulie et al., 1992; Rees & Gibson, 2011; Higgs, 2013).

Os haplótipos são padrões de sítios polimórficos do DNA ligados ao complexo da β -globina que surgiram independentemente em pelo menos cinco diferentes grupos populacionais, e foram denominados de acordo com a região de maior prevalência (Lapouniéroulie et al., 1992). São utilizados como marcadores de características genéticas em *cis*, herdadas juntamente com o gene β^S , podendo influenciar a expressão dos genes γ -globina, e conseqüentemente, os níveis de HbF (Steinberg et al., 1995). A manutenção de níveis aumentados da HbF em pacientes com AF é de suma importância, uma vez que esta hemoglobina tem alta afinidade pelo oxigênio, exercendo um importante papel de mediador na formação dos polímeros de HbS, impedindo a desoxigenação dos eritrócitos (Steinberg et al., 1995; Akinsheye et al., 2011).

Os haplótipos são designados de Benin (BEN), Bantu ou República Central Africana (CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-Indiano ou Saudi-Árabe (ARB ou SAU) (Pagnier et al., 1982; Rusanova et al. 2011). Portadores de AF e haplótipo SEN ou ARB apresentam níveis elevados de HbF (>15%), desenvolvendo assim uma forma clínica mais branda da doença, já pacientes que apresentam haplótipo CAR (ou Bantu) desenvolvem um curso clínico mais grave, por cursarem com níveis diminuídos de HbF (< 5%), e, pacientes que possuem o haplótipo Benin apresentam quadros clínicos intermediários (Steinberg 2005; Cajado et al. 2011).

Bezerra e colaboradores (2007), em um estudo envolvendo 74 pacientes com AF no estado de Pernambuco, encontraram o haplótipo Bantu (ou CAR) como o mais prevalente na população, correspondendo a 81,1% seguido do haplótipo Benin com 14,2% (proporções apresentadas na figura 1). Domingos e colaboradores (2014), analisando a associação de moduladores genéticos com o risco de desenvolvimento de AVC em 261 pacientes com AF do estado de Pernambuco, encontraram o haplótipo CAR associado a um maior risco no desenvolvimento de complicações cerebrovasculares (Domingos et al., 2014).

Figura 1 - Padrões de distribuição dos haplótipos β^S na África e em alguns estados do Brasil. As setas indicam os locais de origem e destino.



Fonte: Dal-Ri Lindenau, 2009.

Os dados disponíveis relacionados à frequência dos haplótipos no Brasil mostram uma predominância do haplótipo CAR em diferentes estados como Bahia, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Rio Grande do Sul (Figueiredo et al., 1996; Bezerra et al., 2007; Fleury, 2007; Silva et al., 2014). Fatores históricos da migração de escravos originários da África no século XIX, é o responsável pela distribuição dos haplótipos no Brasil. Os relatos históricos do período de colonização relatam o Rio de Janeiro como principal distribuidor de escravos. Desta forma, o haplótipo CAR tem uma frequência representativa no Estado com 54,0% seguido do BEN com 44,6% (Fleury, 2007).

Tomando conhecimento da importância da HbF na evolução clínica dos pacientes com AF, esta passou a ser o principal alvo de estudos farmacológicos, em que foi descoberto o uso terapêutico da hioxicarbamida ou hidroxiureia (HU). Comumente utilizado em neoplasias mieloproliferativas crônicas, foi observada a capacidade de atuar no controle da divisão celular mantendo os níveis de síntese da HbF elevados na fase adulta nos pacientes falciformes (Steinberg, 1998; Conran & Costa 2009). Seus efeitos são associados com diminuição dos eventos de dor e vaso-oclusão, dos episódios de priapismo e síndrome torácica aguda (Steinberg, 1998; Steinberg et al., 2013).

Outro importante modulador da variabilidade fenotípica na AF, é a co-herança com a talassemia alfa (α) (Hassan et al., 2014). Ocorre quando há diminuição ou ausência de síntese das cadeias globínicas alfa (α) da molécula de hemoglobina, podendo ser decorrente de deleções ou mutações pontuais nos genes α^1 e /ou α^2 . A talassemia α^1 ou α^0 é caracterizada pela perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$) e, a talassemia α^2 ou α^+ é representada pela perda de um dos genes α em pelo menos um dos cromossomos ($-\alpha/\alpha\alpha$) (Higgs, 2013). Dentre as causas de talassemia alfa, a α^2 mostra-se como mais frequente, apresentando dois tipos de deleções, a de 3.7Kb e de 4.2Kb (Dodé et al., 1993).

A relação da talassemia alfa com a AF tem como consequência a redução do volume corpuscular médio (VCM), menor grau de hemólise e conseqüentemente, menor número de reticulócitos, conferindo assim uma melhora nos parâmetros hematológicos da doença quando observamos as manifestações clínicas decorrentes de processos hemolíticos, como as úlceras de perna (Hassan et al., 2014; Kato et al, 2006).

Entretanto, os benefícios acarretados por esta co-herança, sobretudo na redução da concentração de hemoglobina intracelular (incluindo as moléculas de HbS), ainda não estão completamente estabelecidos. A partir do momento em que ocorre a diminuição da concentração de cadeias alfa-globínicas, há uma resposta compensatória do organismo, sendo necessário aumentar a produção das células vermelhas. Diante disso, o sangue destes pacientes torna-se mais concentrado e viscoso, fato que provoca uma maior frequência de episódios dolorosos e recorrentes crises vaso-oclusivas (Kato et al., 2007). O aumento da viscosidade sanguínea provoca elevação da pressão intramedular, comprometendo a microcirculação nos ossos, levando a hipóxia e infarto na superfície articular, favorecendo o aparecimento de osteonecrose (Ballas & Marcolina, 2005; Shah et al., 2015).

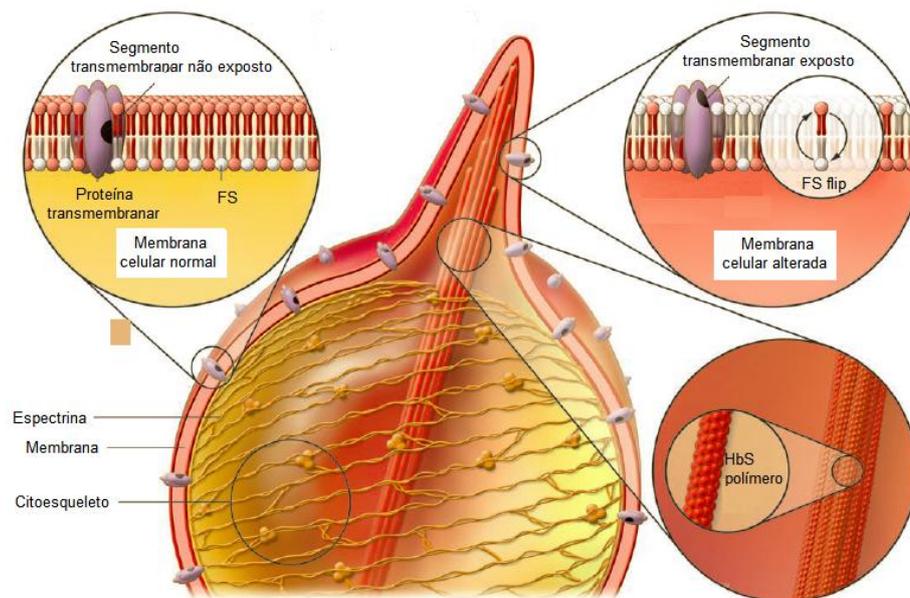
Desse modo, a co-herança com a alfa talassemia pode conduzir a manifestações fenotípicas distintas, que devem ser analisadas individualmente, de acordo com o quadro clínico apresentado (Hassan et al., 2014).

2.1.3 Fisiopatologia e as manifestações clínicas

As manifestações clínicas nas doenças falciformes, derivam primariamente da anormalidade molecular representada pela HbS. As moléculas de HbS quando desoxigenadas, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central. A deformação mais conhecida é provocada por feixes de polímeros se organizando paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada” (Connes et al., 2015).

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

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



Fonte: Adaptado: Frenette & Atweh, 2007

Em condições normais, as hemácias têm a capacidade de deformabilidade que lhes permite circular através de vasos estreitos, carregando o O_2 para todos os tecidos do corpo. Entretanto, quando a HbS sofre desoxigenação, a valina hidrofóbica (presente no lugar do ácido glutâmico polar) é exposta na superfície da cadeia β^S , levando a polimerização da HbS por meio de interações hidrofóbicas e à falcização das hemácias. O fenômeno de falcização tem condicionantes que o facilitam ou dificultam. Para que as moléculas de HbS se agreguem é necessário que, além de

desoxigenadas, estejam em elevada concentração o que facilita sua associação (Ballas & Mohandas, 2004).

As mudanças moleculares que ocorrem no interior da célula levam a alterações que se amplificam provocando o aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeia fenômenos inflamatórios com participação dos granulócitos e plaquetas. A fragilidade da membrana diminui o tempo de vida da célula, e exacerba a hemólise, com conseqüente diminuição do óxido nítrico (Kato et al., 2009; Manwani & Frenette, 2013).

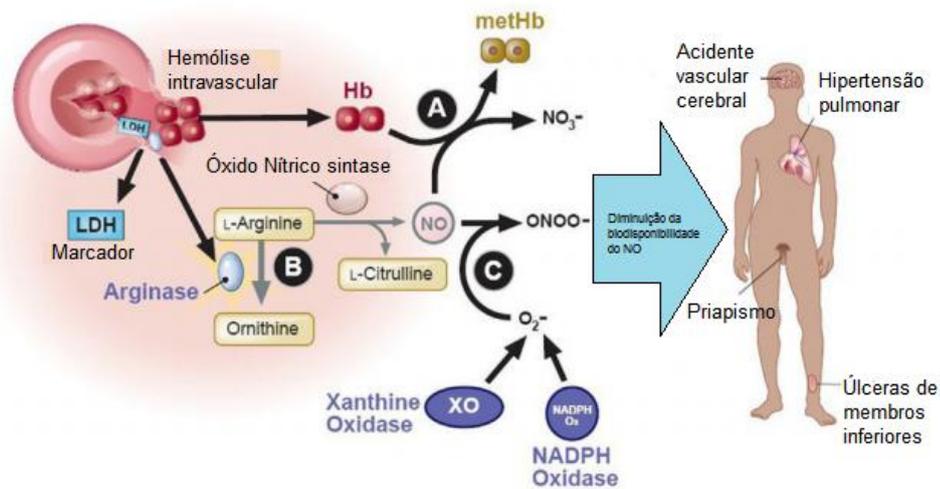
O óxido nítrico (ON) é um gás produzido pelo endotélio vascular, sendo um potente regulador do tônus da musculatura lisa dos vasos, figura 3. Devido à hemólise crônica, altos níveis de hemoglobina plasmática circulante e arginase, enzima envolvida na produção do ON, consomem e diminuem a produção do ON. A depleção do ON exacerba o fenômeno de vasoconstrição, que por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização das hemácias. (Kato et al., 2006; Kato et al., 2007; Claudino & Fertrin, 2012; Fens et al., 2014).

Além de produzir ON, as células endoteliais liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e vasoconstritor. Além da ação vasoconstritora, esse peptídeo aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 (moléculas de adesão) solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como interleucinas (IL) 1, IL-6, IL-8 e TNF- α além de substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos que são ativados (Kato et al., 2005; Lanaro et al., 2009).

As plaquetas também são estimuladas pela presença dessas citocinas inflamatórias, e liberam multímeros de von Willebrand que favorecem a ligação entre plaquetas, endotélio e o eritrócito falciforme. Toda essa interação de células e

endotélio, culmina na nos eventos vaso-oclusivos frequentemente observados na AF (Manwani & Frenette, 2013; Zhang et al., 2016).

Figura 3 – O papel da hemólise na disfunção vascular na anemia falciforme. Este modelo descreve algumas das vias ativadas em doença falciforme, incluindo hemólise intravascular e o consumo de NO pela hemoglobina extracelular. (A) Hemoglobina livre no plasma inativa NO, gerando metemoglobina e nitrato inerte. (B) Arginase no plasma consome L-arginina e converte em ornitina, esgotando a sua disponibilidade para a produção de NO. (C) LDH também liberado da hemácia serve como um marcador para a magnitude da hemólise e liberação da arginase. NO também é consumida por espécies reativas de oxigênio, originadas pelos altos níveis de atividade da xantina oxidase e atividade da NADPH oxidase observada na doença falciforme. Como resultado final, há diminuição da biodisponibilidade do NO contribuindo com a vasoconstrição, culminando dos eventos patológicos, como priapismo, hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral e úlceras de perna.



Fonte: Adaptado de Kato et al., 2009.

Diante deste perfil, a AF apresenta um quadro inflamatório crônico exacerbado por episódios agudos que se interligam e se retroalimentam com a hemólise, formando um ciclo inflamatório permanente (Sparkenbaugh & Pawlinski, 2013). Apesar da inflamação crônica associada à AF ser usualmente considerada decorrente dos episódios de vaso-oclusão, há contribuição efetiva dos eventos hemolíticos. Marcadores de hemólise como a lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina indireta e níveis de reticulócitos, foram correlacionados como sendo fatores risco presentes em

pacientes com priapismo, acidente vascular cerebral e com úlceras maleolares (Kato et al., 2006; Taylor et al., 2008; Nouraie et al., 2013; Mikobi et al., 2015).

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

Portanto, não há um evento único responsável pelas manifestações clínicas na AF. Nas úlceras maleolares, a hemólise e a vaso-oclusão contribuem no surgimento da lesão sendo agravada ainda por fatores externos e alterações genéticas que impedem a rápida cicatrização (Kato et al., 2007; Nouraie et al., 2013).

2.2 Úlceras Maleolares

A úlcera maleolar ou úlcera de membros inferiores (UM) é uma das manifestações cutâneas da anemia falciforme mais comum. Ocorrem em áreas com menos gordura subcutânea, pele fina, e com diminuição do fluxo sanguíneo. Os locais mais comuns são o maléolo medial e lateral (tornozelos), muitas vezes tornando-se circunferencial se não for controlada cedo. Locais menos comuns de acometimento são a região anterior da tíbia, dorso do pé e tendão de Aquiles (Serjeant et al., 2005; Minnit et al., 2010, 2013).

Ocorrem entre 8% a 10% dos pacientes homozigotos para a HbS na América do Norte, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A causa exata do surgimento do processo ulcerativo ainda não está clara, mas há um consenso de que seu surgimento é multifatorial (Serjeant et al., 2005; Paladino, 2007).

A cicatrização da úlcera é lenta, evoluindo por meses ou anos. A pele que recobre a região cicatrizada é fina, despigmentada e atrófica, particularmente sujeita à ulceração recorrente. A qualidade de vida dos pacientes que desenvolvem essas lesões é comprometida. Os efeitos sociais e educacionais refletem-se no abandono escolar e maior índice de desemprego, gerando dificuldades sociais e familiares, principalmente em países em desenvolvimento (Serjeant et al., 2005).

Há duas formas distintas para o surgimento das lesões: alguns pacientes apresentam história prévia de traumas com infecção secundária e culminam na abertura da úlcera; em outros, espontaneamente surge área dolorosa em pele ainda normal, seguida de edema e vermelhidão, evoluindo rapidamente para lesão (Steinberg, 2008; Minniti et al., 2010).

As UM podem ser classificadas quanto aos índices de gravidade, em que são baseados no tamanho, intensidade e duração. As fases de formação da ulceração podem ser descritas em quatro principais estágios (Minniti et al., 2010):

Fase 1: formação de eritema na pele intacta. Quando há lesão, já se inicia o processo de ulceração da pele. Em indivíduos com pele mais escura pode ocorrer descoloração da pele na região; calor, edema e endurecimento também podem ser indicadores;

Fase 2: diminuição da espessura parcial da epiderme, derme ou envolvendo as duas. A úlcera é superficial e apresenta-se clinicamente como uma bolha ou uma cratera rasa;

Fase 3: Perda total da espessura da pele, envolvendo danos ou necrose do tecido subcutâneo que pode se aprofundar, mas não completamente, envolvendo a fáscia muscular. A úlcera se apresenta clinicamente como uma cratera profunda com ou sem prejuízo do tecido adjacente;

Fase 4: Perda da espessura total da pele, com extensa destruição, necrose dos tecidos ou danos ao músculo, osso ou estruturas de suporte (por exemplo, tendão e cápsula articular).

Figura 4 – Imagens de úlceras maleolares de pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope em 2013.



Fonte: Fotos cedidas por Carolina Sanuzi.

De acordo com sua duração, as úlceras podem ser classificadas em agudas ou crônicas. Entretanto não há uma definição consensual que defina um período específico para a cronicidade, aceitando-se, de modo geral, aguda quando há cicatrização em menos de um mês, e crônica com duração acima de 2 meses, não

sendo rara a permanência desta por vários anos em fenômeno contínuo de cicatrização e reabertura (Minniti et al., 2010).

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

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

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

A recorrência das úlceras é frequente, e o processo de cicatrização é lento e ainda não há tratamentos definitivos (Minniti, et al., 2010). Os motivos pelos quais elas

surgem espontaneamente e porque se tornam crônicas, vem sendo esclarecidos por estudos que avaliam disfunções nas vias de ativação dos genes envolvidos nos mecanismos de reparo. Mutações que descontrolam estas vias podem ser responsáveis pela cronicidade do processo. A principal via participante na recuperação de lesões, é a via do fator transformador do crescimento (TGF) (Jude et al., 2001).

Estudos recentes investigam o papel dos genes com função na modulação de respostas inflamatórias. Realizando estudos de associação de polimorfismos de base única, Nolan e colaboradores (2006) verificaram o envolvimento de polimorfismos na via de ativação do gene *TGFB* (do inglês, *transforming growth factor β*) no desenvolvimento de úlcera de perna em portadores da DF. Assim como Fertrin e Costa (2010), também baseados no mesmo princípio, relataram em um artigo de revisão o envolvimento da via do TGF- β com as principais manifestações clínicas na AF, ressaltando seu papel na ocorrência da UM (Fertrin & Costa, 2010).

2.3 Fator Transformador do Crescimento (TGF- β)

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica com atuação importante no curso patológico de úlceras gástricas e de pele. Regula o processo de cicatrização, reepitelização, inflamação local e formação de granulação do tecido (Tanigawa et al., 2005; Pastar et al., 2010). É uma citocina multifuncional com fortes efeitos sobre o sistema imunológico, sendo secretada por diversos tipos celulares: células T, fibroblastos, células epiteliais e plaquetas (Lawrence, 1995).

O mecanismo pelo qual essas funções ocorrem, é dependente de interação do TGF- β com receptores na superfície celular, que desencadeará a ativação de

diferentes vias de sinalização e regulação da homeostase em praticamente todos os tecidos do organismo (Massangué, 1998; Shi & Massangué, 2003). Somente a molécula ativa é capaz de se ligar ao seu receptor, e este mecanismo representa um sistema típico de interação ligante-receptor, seguido de transdução de sinal e culminando em um efeito biológico. Existem três isoformas de TGF- β que são codificados por genes distintos: TGF- β 1, localizado no cromossomo 19q13.1, TGF- β 2 (1q41) e TGF- β 3 no cromossomo 14q24 (Massagué, 1998).

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

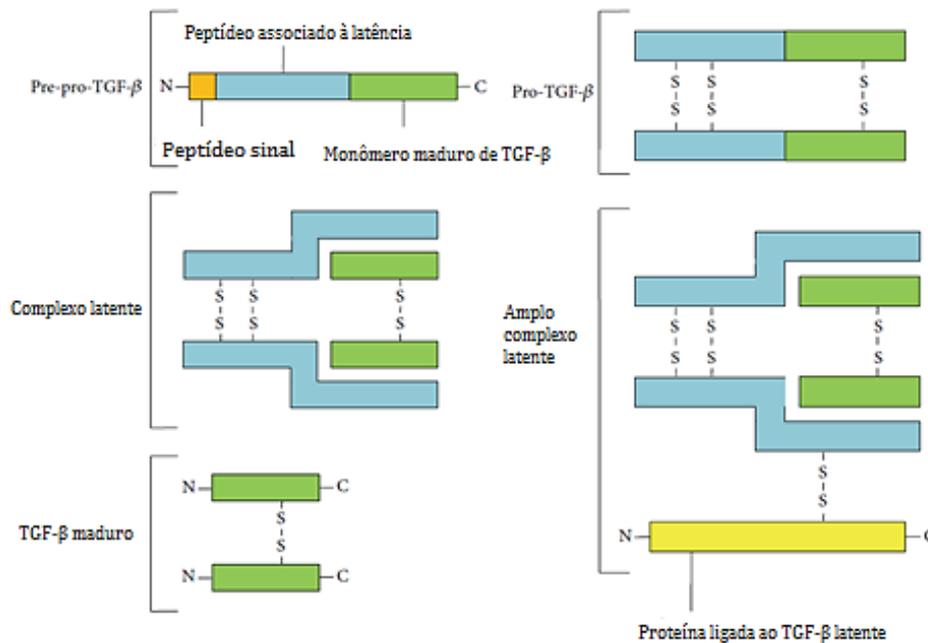
2.3.1 Ativação do TGF- β

TGF- β é sintetizado de uma forma precursora latente que é clivada em sua via secretória, em um pró-peptídeo amino-terminal e um fragmento carboxi-terminal, constituindo sua forma madura. Entretanto, o TGF- β maduro ainda permanece associado covalentemente ao seu pró-peptídeo após ser secretado. Nesta configuração, a citocina não pode ser reconhecida pelos receptores (Shi & Massangué, 2003).

Desta forma, o emprega-se o termo “proteína associada à latência” (LAP). Um conjunto de glicoproteínas secretoras, conhecidas como proteínas de ligação a TGF- β -latente, são covalentemente associadas à LAP por pontes dissulfeto. Formando assim, um estoque de TGF- β -latente na matriz extracelular que será transformado em

ativo quando exigido pela célula, sofrendo influência de fatores como proteases e mudanças de pH (figura 5) (Poniatowski et al., 2015).

Figura 5 – Representação esquemática das diferentes formas estruturais do TGF- β durante a síntese, secreção e ativação.



Fonte: Adaptado de Poniatowski et al., 2015

2.3.2 Via de Sinalização do TGF- β

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

A via de transdução do sinal do TGF- β inicia-se com a ligação do peptídeo TGF- β ao receptor tipo II específico (TGFRII) o qual fosforila e ativa o receptor tipo I (TGFRI) (figura 6). Estes receptores são moléculas transmembranares com domínio de

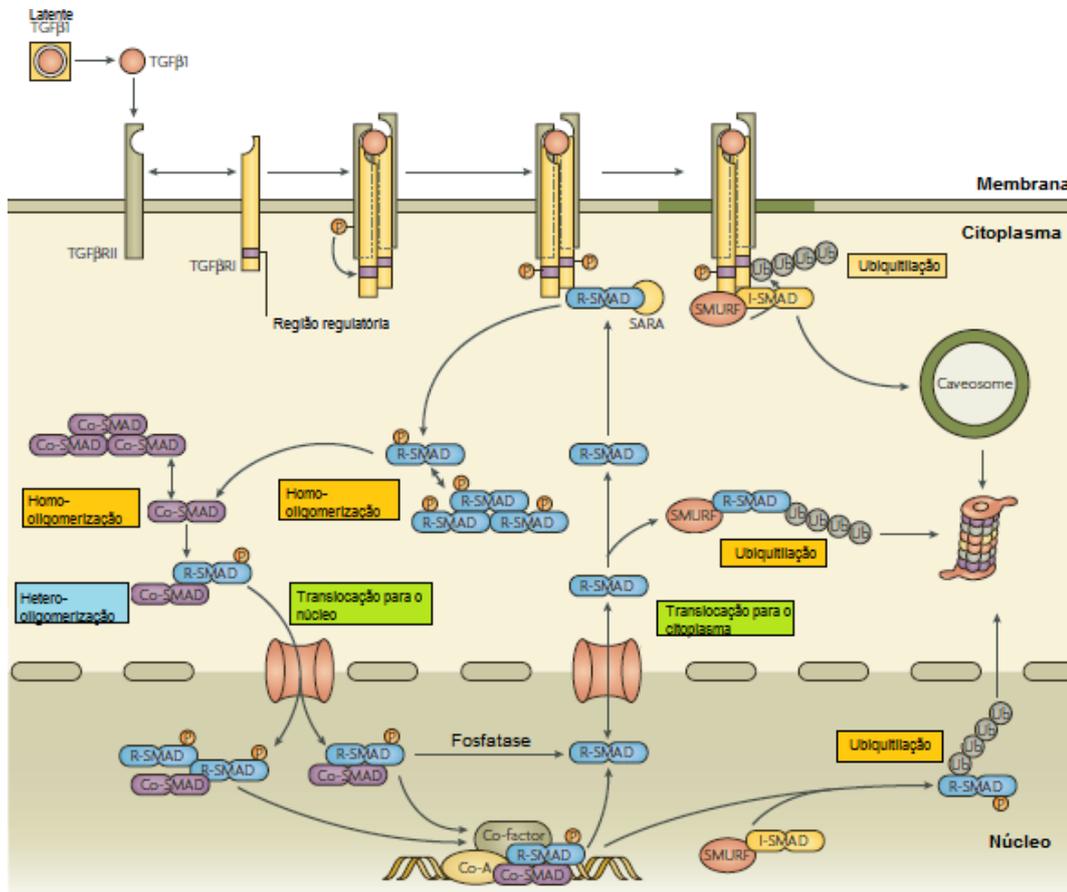
serina/treonina cinase (Massangué, 1998). O receptor tipo III (TGFRIII), conhecido como betaglicana, não tem um papel direto na via de sinalização do TGF- β , por vezes facilita o acesso da citocina aos receptores do tipo I e II (Ramirez et al., 2013).

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

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

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

Figura 6 – Desenho esquemático ilustrando a via de sinalização do TGF- β . Transdução de sinal superfamília TGF- β /BMP. Ligantes do TGF- β , se ligam a receptores do tipo II, que, em seguida recrutam os receptores do tipo I levando a transfosforilação de receptores tipo I. Receptor tipo I ativado fosforila RSmad 2/3, que, em seguida, com o complexo de Smad4, translocam-se para o núcleo onde irão se ligar a regiões específicas no DNA, co-estimuladores ou co-repressores de genes alvo. Esta via é inibida pela I-Smad7 no núcleo, e SMURF1 no citoplasma.

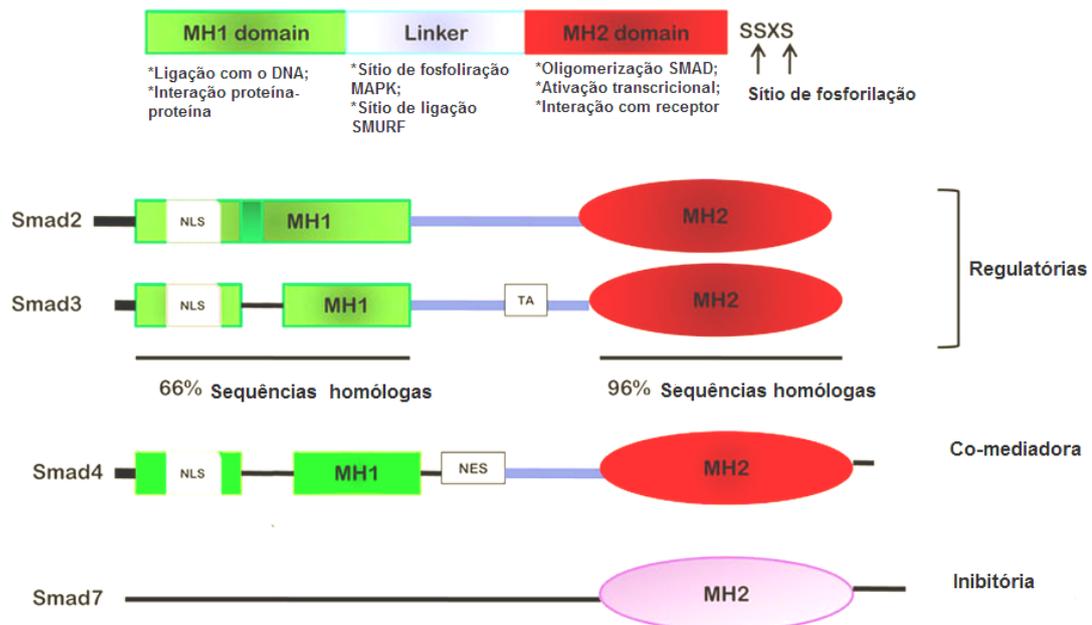


Fonte: Adaptado de Rubtsov & Rudensky, 2007.

SMADs possuem estruturas peculiares, que lhes confere funções diferentes. São constituídas por domínios conservados, amino-terminal (MH1) e carboxi-terminal (MH2), e um domínio central pouco conservado que conecta domínios MH1 e MH2 (figura 7). O domínio MH1 confere às SMADs capacidade de associação com o DNA e interação com fatores de transcrição, enquanto MH2 é importante para formação do complexo SMAD-receptor e confere atividade transcrricional. Embora SMAD2 e SMAD3 compartilhem alta homologia e ambas sejam capazes de responder ao estímulo gerado pelo complexo TGF- β /receptor ou activina/receptor, existem

diferenças funcionais entre as R-SMADs, que poderiam ser explicadas em parte pela capacidade de a SMAD3 se ligar ao DNA, enquanto a SMAD2 apresenta um inserto em seu domínio MH1 que impede sua interação com o DNA (Massangué, 1998; Wrington et al., 2009).

Figura 7 – Domínios estruturais das SMADs. Os domínios MH1 da SMAD2 possui uma sequência adicional de 30 aminoácidos, conferindo 66% de homologia com SMAD3. Esta por sua vez, contém na porção *Liker* uma região de trans-ativação (TA) de ligação com MAPK. Enquanto que a SMAD4, apresenta na porção *Liker* um ponto de sinalização de exportação do núcleo. Comumente, as SMADs possuem *NLS* um sinalizador nuclear, com função de importar o complexo para o núcleo da célula. Em contra-partida, a I-SMAD7, apresenta apenas o domínio MH2, como sendo controlador da fosforilação.



Fonte: Adaptado de Samanta & Datta, 2012.

2.3.3 Regulação negativa da via de sinalização do TGF- β

Além das SMADs envolvidas na transdução da sinalização intracelular dos ligantes da família TGF- β ao núcleo, denominados SMADs regulatórias, a via de sinalização de TGF- β é regulada pelo SMAD7, classificada como SMAD inibitória (I-SMAD), que são induzidas pela sinalização por SMAD, acumuladas no núcleo e

podem ser então exportadas após estímulo via TGF- β . A SMAD7 bloqueia a fosforilação dos R-SMADs, interferindo na fosforilação de SMAD2/3 pelo receptor tipo I e na formação do complexo R-SMAD/ Co-SMAD. A transcrição de SMAD7 é induzida por TGF- β e mediada pela ligação de SMAD3 e SMAD4 na região promotora do SMAD7, este complexo estimula então a desfosforilação do receptor pelo recrutamento de fosfatases, representando um mecanismo auto regulatório da via de sinalização TGF- β , a nível do citoplasma (Massagué, 1998; Xu et al., 2012).

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

Assim como as SMADs possuem uma estrutura com regiões específicas para cada função, as SMURFs também foram expostas ao processo evolutivo resultado na conservação de três principais domínios (figura 8). A porção C2 corresponde ao domínio C-terminal composta de proteínas quinases C conservada, envolvido na transdução de sinal. No meio da estrutura, há domínios WW mantidos, que são responsáveis pela ligação com proteínas SMADs. E por fim do C-terminal, há o HECT, responsável pela ligação de proteínas de ubiquitinação E3 ligases (Suzuki et al., 2002).

Figura 8 – Representação esquemática da proteína inibitória SMURF1.



Fonte: Adaptado de Suzuki et al., 2002

Via de sinalização SMAD é essencial para a maioria das respostas de TGF- β . Entretanto, existe ainda, uma via alternativa que é ativada mediante ligação de mitógenos. Também conhecidas como proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), exercem função importante na fosforilação das SMADs, com sítios de ligação específicos na porção *linker* da proteína (Massagué, 1998).

2.3.4 Papel biológico do TGF- β

Os membros da superfamília do TGF- β se assemelham estruturalmente, compondo 7 resíduos de cisteínas altamente conservados, fazem parte: proteína morfogenética óssea (BMP, do inglês, *bone morphogenetic protein*), fator diferenciador do crescimento (GDF, do inglês, *growth differentiation factor*), substância müllerian inibidora (MIS, do inglês, *müllerian inhibiting substance*) e inibinas (Massagué, 1998).

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

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

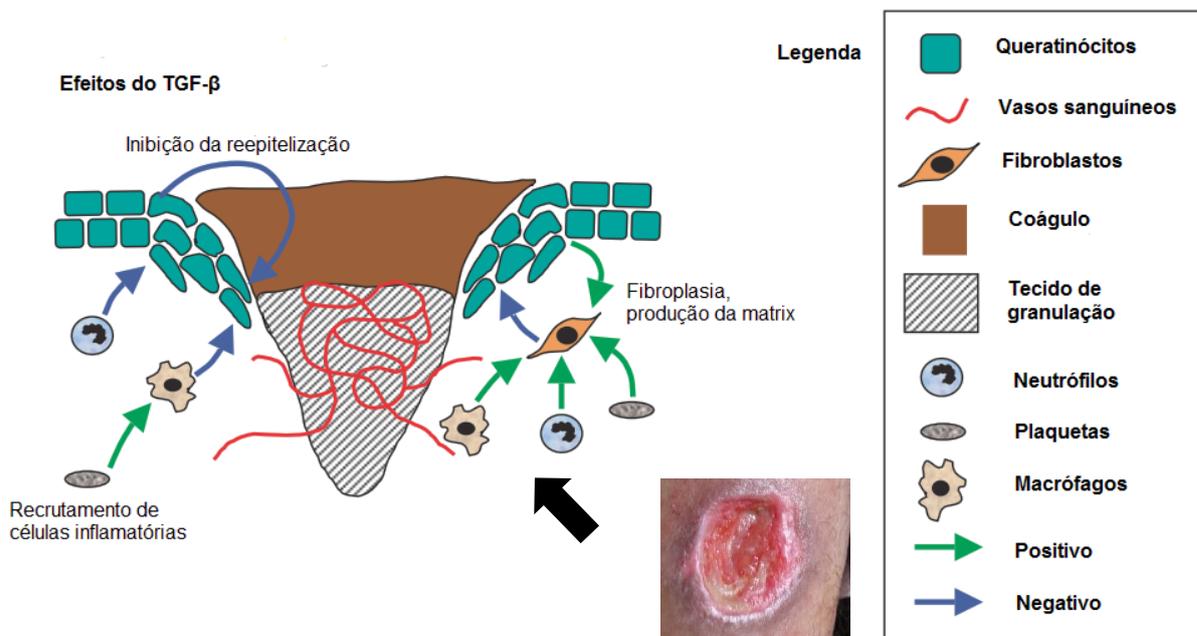
O TGF- β é comumente classificado como uma citocina anti-inflamatória, de resposta Th-2, reguladora do sistema imunológico. Os mecanismos coordenados pelas vias de sinalização incluem: a) supressão da diferenciação de células T efetoras; b) conversão de células T naive em células T regulatórias; c) inibição da produção de citocinas efetoras, tais como IL-2, IL-4, Interferon gama (IFN- γ) e TNF-alfa e; d) supressão da atividade de macrófagos, células dendríticas e células NK (Rubtsov & Rudensky, 2007).

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

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

Nos processos de reparo tecidual, o TGF- β é a principal citocina a ser ativada e responsável por manter a homeostase local. O mecanismo de reparação é um evento que começa imediatamente depois do ferimento (figura 9). Envolve, principalmente, inflamação caracterizada por eventos vasculares e celulares (Werner & Grose, 2003; Ramirez et al., 2013).

Figura 9 – Funções do TGF- β na cicatrização de lesões teciduais.



Fonte: Adaptado de Werner & Grose, 2003.

Após instalada a lesão tecidual, há formação de coágulo, deposição de fibronectina, reepitelização, neovascularização e fibroplasia. Tanto em feridas bucais quanto em feridas de pele estão envolvidos múltiplos tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais), mediadores solúveis (fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas), insolúveis (componentes da matriz extracelular) numa sequência de eventos que compreende 3 fases: inflamação, proliferação (especialmente fibroblastos) e remodelação (Werner & Grose, 2003; Kim

Byung-Chul et al., 2003). Nos pacientes com anemia falciforme, a ocorrência de vaso-oclusões subsequentes a formação das hemácias falcizadas, compromete o fluxo sanguíneo local, conduzindo a hipóxia tecidual local resultando em úlceras de perna (Minniti et al., 2010).

Diante da compreensão das funções do TGF- β , estratégias terapêuticas para acelerar a recomposição dérmica em lesões e inibir a proliferação celular em patologias cancerígenas, vêm sendo estudas como formas de melhorar tratamentos médicos (Arno et al., 2014).

2.4 Polimorfismos genéticos no estudo das úlceras maleolares na anemia falciforme

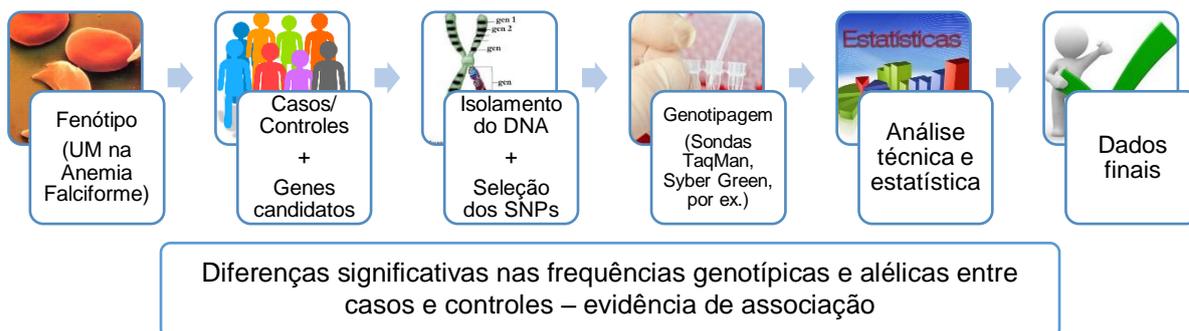
Os estudos de associações de polimorfismos genéticos vêm ganhando um valor crucial no que concerne ao entendimento da variabilidade fenotípica da anemia falciforme. Uma vez que interações das modificações genéticas com o ambiente em que o indivíduo vive, podem responder a alguns questionamentos a respeito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

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

Polimorfismos de base única (*SNP*, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) referem-se a uma única diferença de nucleotídeos (A, T, C, ou G) no genoma de uma população, nos quais são focados a maioria dos estudos GWAS (do inglês, *Genome-Wide Association Study*). Os SNPs são as formas mais abundantes de variações encontradas no genoma humano (o genoma humano tem aproximadamente entre 10 a 20 milhares de SNPs [<http://www.genome.gov>]). A ideia básica dos GWAS é rastrear todo o genoma procurando associações com certas doenças. A motivação é que tais associações podem fornecer novos candidatos para as variantes nos genes causais (ou em seus elementos regulatórios) que desempenham um papel para o fenótipo de interesse (Xu & Taylor, 2009).

A força da associação entre cada SNPs e a doença é calculada com base na prevalência de cada SNPs nos pacientes casos (portadores de uma determinada patologia) e nos pacientes controles (não portadores da patologia em estudo) (Lewis, 2002; Pacheco & Moraes, 2009). Para a realização destes tipos de análises, alguns passos devem ser seguidos para padronização dos estudos e das populações analisadas, ver exemplo de fluxograma tomando como patologia de referência a anemia falciforme, no nosso trabalho (figura 10) de atividades sugerido por Pacheco & Moraes (2009).

Figura 10 – Fluxograma de atividades realizadas em estudos GWAS. O fenótipo apresentado é apenas um exemplo de patologia que abordamos no nosso estudo.

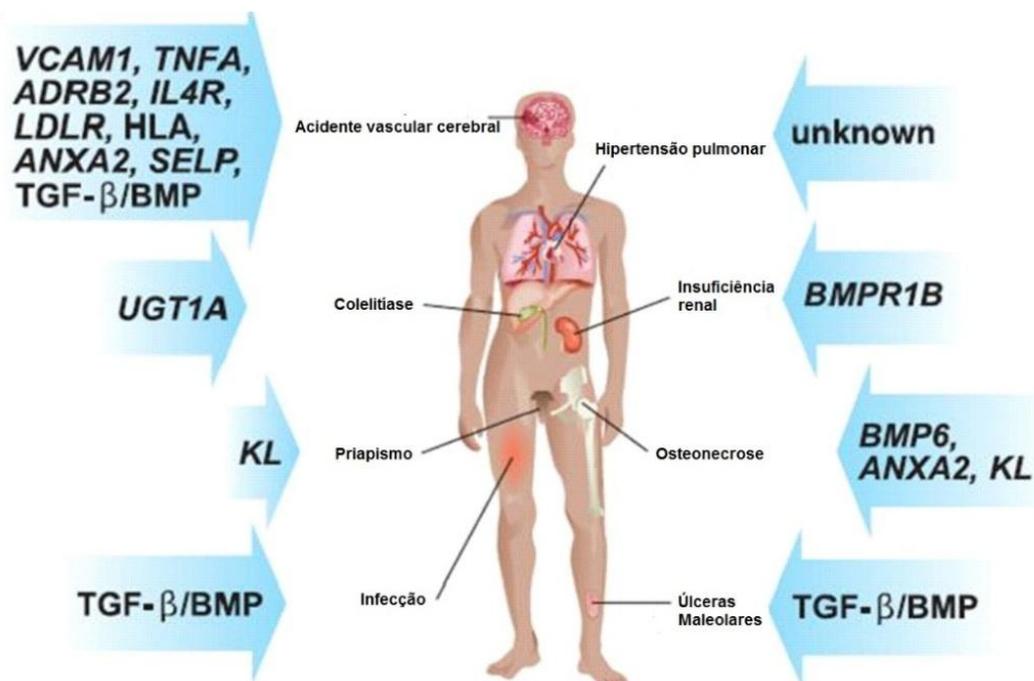


Fonte: Adaptado de Pacheco & Moraes, 2009.

Descobrir um SNP associado poderia significar a causa direta do desenvolvimento de certa doença, mas alternativamente, pode significar apenas uma ligação genética ao SNP causal. Portanto, uma investigação mais aprofundada e um mapeamento fino das áreas em torno de SNPs associados geralmente são necessários (Balding, 2006; Lunetta, 2008).

Diante deste contexto, vários estudos investigam como e quais variações genéticas podem estar sendo responsáveis pela diversidade fenotípica na anemia falciforme. A explicação para questionamentos sobre: o porquê alguns pacientes desenvolvem úlceras de perna, sem causa prévia e outros não? Por que uns convivem longos anos com a ferida aberta, enquanto em outros elas logo cicatrizam? Podem começar a serem esclarecidas a partir de estudos com SNPs em genes de vias específicas da inflamação e cicatrização (Nolan et al., 2006; Bandeira et al., 2014). Um demonstrativo resumindo da gama de estudos com SNPs em anemia falciforme pode ser vista na figura 11 (Steinberg, 2008).

Figura 11 – SNPs em genes pertencentes das vias da inflamação, do metabolismo ósseo e cicatrização, associados com algumas manifestações clínicas da anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de Steinberg, 2008.

Baldwin e colaboradores (2005) publicaram um estudo analisando SNPs em genes candidatos (pertencentes a via da inflamação, do estresse oxidativo e metabolismo ósseo) relacionados com osteonecrose em pacientes com doença falciforme. Os resultados mostraram que SNPs nos genes *BMP6* (proteína morfogenética óssea 6), *ANXA2* (Anexina A2) e *KL* (Klotho), importantes moduladores da morfogênese óssea, metabolismo ósseo e homeostase vascular, foram associados a osteonecrose em pacientes com doenças falciformes.

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

foram selecionados de acordo com seu envolvimento na modulação na fisiopatologia da doença, atuando em vias de: estresse oxidativo, metabolismo do NO, fatores de crescimento e mediadores da inflamação e angiogênese. A partir do mapeamento realizado, 129 SNPs de 47 genes possivelmente relacionados com UM foram avaliados, sendo os principais pertencentes à superfamília do TGF- β : *MAP3K7* (rs157702), *SMURF1* (rs219825) e *SMAD7* (rs736839).

A desregulação da função e dos níveis destas proteínas estão correlacionados com diminuição da expressão dos receptores do TGF- β e conseqüentemente altera toda a transdução de sinais intracelulares, ocasionando distúrbios fibróticos e de proliferação celular (Nolan et al, 2006; Liu & Pravia, 2010; Pastar et al., 2010). Os dois genes que selecionamos para o estudo, são responsáveis pela codificação de duas proteínas inibitórias (*SMAD7* e *SMURF1*) da via de sinalização do TGF- β . O gene *SMAD7* está localizado no cromossomo 18 (Cr.18q21.1). O polimorfismo é identificado pela numeração rs736839. A substituição de C>T; apresenta MAF (frequência alélica mínima) de 0,33, e está localizado em uma região intergênica próxima ao gene *SMAD7*. A frequência na população mundial de C de 67% e T é 33% [<http://www.1000genomes.org/>].

O segundo polimorfismo estudado está presente no gene que codifica a proteína inibitória *SMURF1*. O gene *SMURF1* está localizado no cromossomo 7 (Cr.7q22.1) e codifica a proteína específica E3 que exerce a função de ubiquitinação. É responsável pela degradação do complexo *SMAD2/SMAD3* quando saem do núcleo e migram para o citoplasma. Mas só é ativada quando ocorre o sinal celular para inativar a fosforilação das proteínas estimulatórias (*SMAD2* e *SMAD3*) (Massagué, 2000). O polimorfismo rs219825 (C>G) neste gene está localizado no íntron e provoca *splicing* alternativo com produção de quatro transcritos variantes. Dois deles resultam

na codificação de duas isoformas da proteína SMURF1. A primeira isoforma tem 757 aminoácidos e a segunda de 731 aminoácidos. Ambas têm a função alterada e não se ligam corretamente ao complexo SMD2/SMAD3 no citoplasma. A frequência na população geral para os alelos é de C (48,0%) e G (52,0%) [<http://www.1000genomes.org/>].

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

Diante da importância de um perfeito funcionamento da via de sinalização do TGF- β , buscamos investigar os SNPs nos principais genes desta via, e a relação com a ocorrência das úlceras de perna nos pacientes com anemia falciforme.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar a influência de polimorfismos nos genes *SMAD7* e *SMURF1*, correlacionando-os com a ocorrência das úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme em duas coortes independentes.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas resultantes dos polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825) em pacientes com anemia falciforme com e sem úlceras maleolares de duas coortes independentes;
- Investigar a associação dos polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825), com a ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme.

4. Material e Métodos

4.1 Casuística

O estudo é do tipo coorte transversal com comparação de grupos, formado por pacientes com anemia falciforme (HbSS) não aparentados e de ambos os sexos. A amostra é formada por pacientes acompanhados regularmente no ambulatório do Hospital de Hematologia de Pernambuco- HEMOPE, e do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti- HEMORIO, em parceria com a pesquisadora Dra. Clarisse Lobo.

A seleção dos pacientes foi realizada por análise dos prontuários médicos, e quando necessário, foram convocados por telefone ou telegrama. Para a análise molecular, foi coletado cerca de 5,0 ml de sangue periférico em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante e conduzido para o laboratório de Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco. As coletas só foram iniciadas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por cada paciente selecionado. As amostras oriundas do HEMORIO vieram acondicionadas sob refrigeração, já em fase de DNA genômico.

Obtivemos um total de 528 pacientes aptos a participarem do estudo. Destes 331 pertencentes ao estado de Pernambuco, sendo 131 casos de úlceras e 200 controles. Em relação aos pacientes do Rio de Janeiro, são 108 casos de úlceras e 89 controles.

Utilizamos como critérios de inclusão para o grupo caso: aqueles que em algum momento da vida ou durante a censura da pesquisa desenvolveram úlceras de membros inferiores. Neste grupo, estão inseridas lesões ativas e cicatrizadas; agudas

e crônicas. Foram excluídos aqueles que apresentaram lesões não conclusivas de ulceração (por exemplo, furúnculos e picadas de insetos que formaram pequenas lesões que não progrediram) (Minniti, et al., 2013).

Enquanto que no grupo controle, fizeram parte da análise pacientes com anemia falciforme que até o momento não desenvolveram traumas que evoluíram para úlceras. Foram excluídos: pacientes que não comparecem regularmente ao ambulatório e não seguem com o tratamento; e os que apresentam sinais flogísticos (característicos) de inflamação permanente nos membros inferiores, que até o momento não abriu a lesão.

4.2 Análises laboratoriais

As análises dos dados laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação de hemoglobinas) foram obtidos dos resultados de exames de rotina, fixados nos prontuários médicos. Estas informações foram devidamente obtidas quando os pacientes encontravam-se fora de crises álgicas e hemolíticas. A quantificação das hemoglobinas (HbF, HbS e HbA₂) em ambos os hemocentros, foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA), dosadas após os cinco anos de idade e antes do início do tratamento com hidroxiuréia.

4.3 Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOPE e CCS/UFPE, sob número CAAE 05094213.6.3001.5208195 de aprovação (Anexo A) e Fundação HEMORIO sob número 000054/33/01/2012. Desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Informado (Apêndice A).

4.4 Estudo molecular

4.4.1 Extração de DNA genômico

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

Em suma, o princípio da técnica consiste em promover a extração de DNA de sangue periférico utilizando-se fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. À mistura de fenol/clorofórmio é adicionado álcool isoamílico. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução,

enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e possam ser separados facilmente por centrifugação. Segue posteriormente a descrição detalhada da técnica.

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

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400 μl da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25 μl de SDS 10% e incubado à 55°C durante 30 minutos. Após esse período, 180 μl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior e mantida a temperatura ambiente por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura de clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

4.4.2 Caracterização dos pacientes quanto aos marcadores moleculares clássicos da AF

Os haplótipos do gene β^S foram determinados por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de análise de restrição (RFLP), sendo analisados 6 sítios polimórficos para definir os haplótipos: 5' γ^G -*Xmn* I, γ^G -*Hind* III, γ^A -*Hind* III, $\psi\beta$ -*Hinc* II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc* II e 5' β -*Hinf* I (Bezerra et al., 2007). A pesquisa da mutação $-\alpha^{3,7Kb}$ foi investigada por *gap*-PCR, utilizando-se os iniciadores C2 (5' CCATGCTGGCACGTTTCTGA 3') e C10 (5' GATGCACCCACTGGACTCCT 3'), onde os oligonucleotídeos iniciadores se ligam na região que compreende a possível deleção, gerando padrões distintos de produtos de amplificação, conforme previamente descrito (Dodé et al., 1993).

4.4.3 Análise Molecular dos Polimorfismos

Foram selecionados para este estudo, dois SNPs localizados nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825) e a metodologia empregada para a realização das genotipagens foi a técnica de PCR em tempo real através da detecção de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) utilizando o sistema TaqMan®.

Os SNPs foram selecionados de acordo com dados da literatura (Nolan et al., 2006) e informações complementares, foram adquiridas em bancos de dados do estudo do genoma humano tais como: 1000 Genomas [<http://www.1000genomes.org>] e dbSNP Short Genetic Variations [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>].

O sistema TaqMan de detecção de polimorfismos consiste de sondas que possuem um marcador fluorescente (repórter) na extremidade 5', capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por um receptor de sinal luminoso (*quencher*), presente na extremidade 3' da sonda. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento só é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação, mas, durante a amplificação, quando a sonda que se hibridizou ao produto-alvo é clivada pela atividade da exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do quencher que não mais será capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do alvo. A principal vantagem deste método, é a hibridização da sonda em regiões previamente desenhadas, com emissão de fluorescência, e geralmente são menos susceptíveis de obter resultados falso-positivos (Applied Biosystems, 2014).

Todas as sondas e *primers* que foram utilizados estão disponíveis como ensaio pronto e validados para o uso em pesquisa de caráter científico no site [<https://products.appliedbiosystems.com>], para o SNP no *SMAD7* (rs736839) o ensaio segue a identificação de C___1076359_10 e para o *SMURF1* (rs219825) o ensaio está identificado como C___1076359_10. Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália).

As condições de reação foram estabelecidas de acordo com o protocolo recomendado pela empresa que comercializa as sondas (Life Technologies, Califórnia, USA). Todos estes procedimentos foram realizados utilizando-se a

infraestrutura do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.4.4 Análises Estatísticas

As características clínicas-laboratoriais dos pacientes foram apresentadas descritivamente. O teste Chi-quadrado ou exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas e o Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento.

Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de Gray utilizado para a comparação das curvas (Kim, 2007). Análises univariadas de regressão proporcional de *Hazard* (PH) foram conduzidas na busca por fatores prognósticos para as complicações. Os fatores que apresentaram um *P*-valor < 0.1 foram selecionados para o modelo de análise multivariada. As variáveis escolhidas foram testadas com a linearidade assumida para todas as variáveis contínuas examinadas por modelos de PH.

Todos os valores de *P* foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation), Stata Statistic/Data Analysis versão 12 (Stata corporation, EUA) e R 2.10.1 (The CRAN project: www.r-project.org).

5. Resultados

5.1 Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes

Os dados de caracterização clínico-laboratorial dos pacientes de duas coortes independentes (Pernambuco e do estado do Rio de Janeiro), de acordo com a ocorrência de úlceras maleolares, estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Após análise de 706 prontuários dos pacientes com AF atendidos no Hemocentro de Pernambuco, 331 foram selecionados para a pesquisa (tabela 1). Destes, 131 compõem o grupo caso (UM presente), e 200 o grupo controle (UM ausente). A UM esteve presente em 131 pacientes (18,5%), sendo mais frequente no gênero masculino com 73 pacientes (55,7%) ($P=0.007$) do que no gênero feminino, com 58 pacientes (44,3%). A mediana da idade de todos os pacientes foi de 32 anos (17-62 anos), e a mediana da idade para o primeiro relato das úlceras foi de 21 anos (10-58 anos).

Quanto aos marcadores moleculares clássicos da doença, o haplótipo CAR/CAR mostrou-se como o mais prevalente em 187 dos pacientes (56,8%) analisados em comparação com as demais combinações haplotípicas que foi de 142 (43,2%) dos pacientes (CAR/BEN, CAR/ATP, BEN/BEN, BEN/ATP ou combinações com CAMER, SEN e SAU). Entretanto não esteve associado com a presença da UM ($P=1.000$). Quanto a co-herança com a alfa talassemia, não foram encontrados resultados de associação com UM ($P=0.243$), onde 83 pacientes (25,2%) apresentaram a mutação (heterozigotos + homozigotos).

Tabela 1 - Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com anemia falciforme de acordo com a ocorrência de úlcera maleolar do estado de Pernambuco.

Caracterização dos pacientes	Todos os pacientes (n = 331)		UM Presente (n = 131)		UM Ausente (n = 200)		OR (IC95%)	P-valor
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)		
Gênero								0.007*
Feminino	177	53,5	58	44,3	119	59,5	1.0 (Ref.)	
Masculino	154	46,5	73	55,7	81	40,5	0.54 (0.34-0.84)	
Idade (anos), mediana	32		34		31			<0.001*
Intervalo	17 - 62		17 - 62		18 - 58			
Haplótipo β^S								1.000
CAR/CAR	187	56,8	74	56,9	113	56,8	1.0 (Ref.)	
Outros ¹	142	43,2	56	43,1	86	43,2	1.06 (0.64-1.57)	
Alfa-tal ($-\alpha^{3,7kb}$)								0.243
Normal	247	74,8	28	78,6	144	72,4	1.0 (Ref.)	
Mutado ²	83	25,2	103	21,4	55	27,6	0.71 (0.42-1.19)	
Hemácias ($\times 10^{12}$ células/ μ L), mediana	2,53		2,49		2,6			0.010*
Intervalo	1,18 – 5,14		1,18 – 4,06		1,71 – 5,14			
Hb(g/dL), mediana	7,9		7,7		8			0.007*
Intervalo	5,2 – 11,5		5,2 – 10,6		5,2 – 11,5			
Ht (%), mediana	23,7		23,3		24,2			0.003*
Intervalo	15,9 – 35,3		16,5 – 31,8		15,9 – 35,3			
Hb F (%), mediana	6,1		5,4		6,8			0.002*
Intervalo	0,5 – 26		0,5 – 16,3		0,9 – 26			
Reticulócitos (%), mediana	9,2		9,8		9			0.063
Intervalo	1,6 – 24,8		3,7 – 24,8		1,6 – 21,7			
Leucócitos ($\times 10^9$ /L), mediana	11,05		10,63		11,4			0.393
Intervalo	2,59 – 27,6		3,3 – 21,9		2,59 – 27,6			
Plaquetas ($\times 10^9$ /L), mediana	396		394		398			0.459
Intervalo	102 – 785		143 – 731		102 – 785			
BT (mg/dL), mediana	2,8		3,2		2,53			0.010*
Intervalo	0,11 – 17,11		0,3 – 17,11		0,11 – 12,73			
BI (mg/dL), mediana	2,44		2,75		2,35			0.076
Intervalo	0,13 – 16,06		0,21 – 16,06		0,13 – 11,17			
LDH (U/L), mediana	915		970		855			0.024*
Intervalo	187 – 3692		244 – 3692		187 – 3410			
AST(U/mL), mediana	44,5		45		43			0.076
Intervalo	14 – 182		14 – 182		15 – 132			

A segunda coorte avaliada foi composta por pacientes com anemia falciforme atendidos no Hemocentro do Rio de Janeiro, (tabela 2). Após análise de 622 prontuários realizados pelos colaboradores, foram obtidos os relatos de 132 casos de úlceras maleolares resultando na frequência de (21,2%) entretanto, foram cedidas para nossa pesquisa 108 casos (UM presente) e 89 controles (UM ausente). A frequência de pacientes do gênero masculino no grupo com UM foi de 52 (48,1%) e do gênero feminino de 56 pacientes (51,9%) ($P=0.020$). A mediana da idade de todos os pacientes foi de 32 anos (15-69 anos). Não foi possível obter dessa população os dados referentes ao primeiro relato da UM.

Quanto aos marcadores moleculares clássicos da doença, o haplótipo CAR/CAR mostrou-se como o mais prevalente, estando presente em 108 (58,7%) dos pacientes analisados, entretanto não mostrou associação para ocorrência da UM ($P=0.654$), em comparação com as demais combinações haplotípicas que correspondeu a 76 pacientes (41,3%) (CAR/BEN, CAR/ATP, BEN/BEN, BEN/ATP ou combinações com CAMER, SEN e SAU). Quanto a co-herança com a alfa talassemia também não encontramos associação com a modulação para a ocorrência de UM ($P=1.000$), na qual 26 pacientes (34,7%) apresentaram a mutação (heterozigotos + homozigotos).

Tabela 2 – Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes com anemia falciforme de acordo com a ocorrência de úlcera maleolar do estado do Rio de Janeiro.

Caracterização dos pacientes	Todos os pacientes (n = 197)		UM Presente (n = 108)		UM Ausente (n = 89)		OR (IC95%)	P-valor
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)		
Gênero								0.020*
Feminino	117	59,4	56	51,9	61	68,5	1.0 (Ref.)	
Masculino	80	40,6	52	48,1	28	31,5	0.49 (0.27-0.88)	
Idade (anos), mediana	32		38		24			<0.001*
Intervalo	15 - 69		15 - 69		18 - 58			
Haplótipo β^S								0.654
CAR/CAR	108	58,7	57	57	51	60,7	1.0 (Ref.)	
Outros ¹	76	41,3	43	43	33	39,3	0.85 (0.47-1.54)	
Alfa-tal ($-\alpha^{3,7kb}$)								1.000
Normal	49	65,3	27	65,9	12	35,3	1.0 (Ref.)	
Mutado ²	26	34,7	14	34,1	22	64,7	0.95 (0.36-2.47)	
Hemácias ($\times 10^{12}$ células/μL), mediana	2,46		2,42		2,51			0.490
Intervalo	1,52 – 3,9		1,52 – 3,9		1,68 – 3,71			
Hb(g/dL), mediana	8,08		8,2		8,01			0.584
Intervalo	5,4 – 11,3		5,67 – 11,3		5,4 – 10,8			
Ht (%), mediana	22,7		22,8		22,7			0.568
Intervalo	15 – 33		15 – 33		15,4 – 31,2			
Hb F (%), mediana	6,1		5,2		6,25			0.089
Intervalo	0,01 – 28,4		0,01 – 28,4		0,5 – 24			
Reticulócitos (%), mediana	9,4		9,2		9,4			0.190
Intervalo	0,2 – 22,7		0,2 – 22,7		0,9 – 19,56			
Leucócitos ($\times 10^9/L$), mediana	9,5		9,22		9,54			0.601
Intervalo	3,96 – 23,7		3,96 – 23,7		4,08 – 23,3			
Plaquetas ($\times 10^9/L$), mediana	424		415		431			0.215
Intervalo	140 – 1216		185 – 1216		140 – 703			
BT (mg/dL), mediana	3,1		2,6		3,45			0.056
Intervalo	0,5 – 18,5		0,5 – 13,5		0,7 – 18,5			
BI (mg/dL), mediana	2,4		1,6		2,6			0.024*
Intervalo	0,1 – 11,6		0,1 – 11,6		0,5 – 9			
LDH (U/L), mediana	951		890		1055			0.044*
Intervalo	174 – 4725		174 – 3450		334 – 4725			
AST(U/mL), mediana	52		51		53,5			0.784
Intervalo	15 – 152		15 – 102		24 – 152			

5.2 Perfil alélico e genotípico dos polimorfismos nos genes *SMAD7* e *SMURF1* e a relação com ocorrência das úlceras maleolares

Para os estudos de associação genética, foram empregados modelos de análise estatística dominante, codominante e recessivo. Abaixo na tabela 3, estão apresentados os principais resultados encontrados no modelo recessivo por melhor representar os dados obtidos (homozigoto variante *versus* selvagem + heterozigoto) e análise univariada para as duas coortes independentes.

Ao analisar a população de Pernambuco com um total de 331 pacientes (tabela 1) as frequências relativas observadas para o SNP no gene *SMAD7* C>T (rs736839) foram as seguintes: o alelo selvagem (C) esteve presente em 42,5% dos casos com UM, e o alelo variante (T) com a proporção de 57,5%. Quanto aos genótipos no grupo com UM as frequências foram: (CC) com 9,5%, (CT) presente em 65,9% e (TT) com 24,6%. No grupo controle sem UM as proporções observadas para os alelos foram: para o alelo selvagem (C) foi de 49,0% e o alelo variante (T) com 51,0%; quanto aos genótipos, as proporções correspondem a (CC) com 8,1%; (CT) 81,6% e (TT) 10,3% dos pacientes analisados.

Não foi possível encontrar resultados estatisticamente significativos para a presença do alelo variante (T) ($P=0.240$), entretanto, no modelo recessivo de associação o genótipo homozigoto variante (TT) está relacionado com a ocorrência de UM (OR=2.87; IC95%=1.55-5.31; $P=0.001$).

No que se refere ao SNP no gene *SMURF1* C>G (rs219825) a frequência do alelo selvagem (C) no grupo com UM foi de 49,6% e do alelo variante (G) de 50,4%. Com relação aos genótipos neste grupo com UM, observamos que (CC) tem frequência de 25,9% dos pacientes, (CG) em 47,6% e (GG) presente em 26,5%.

Enquanto que no grupo sem UM, o alelo (C) foi representado em 57,4% e o alelo (G) com 42,6%. O genótipo selvagem (CC) tem 32,0%, o heterozigoto (CG) com 50,8% e o genótipo homozigoto variante em 17,2%.

A análise alélica mostrou que a variante (G) não apresentou associação com o desenvolvimento de UM ($P=0.053$). Entretanto, na análise empregando o modelo recessivo de associação mostrou o genótipo variante (GG) esteve relacionado com a presença das UM (OR=1.73; IC95%=1.01-2.97; $P=0.050$).

A segunda população de pacientes analisada engloba as amostras do Rio de Janeiro com um total de 197 indivíduos, tabela 3. Primeiramente observando as frequências relativas alélicas do SNP no gene *SMAD7* C>T (rs736839) encontramos o alelo selvagem (C) em 21,8% dos casos com UM, e 78,2% correspondente ao alelo variante (T). Ainda no grupo caso, as frequências genotípicas foram: (CC) com 3,7%, (CT) 36,1% e (TT) em 60,2% dos pacientes. Já no grupo controle, o alelo selvagem (C) esteve representado em 37,5% dos pacientes, enquanto que o alelo variante (T) corresponde a 62,5%. As proporções genotípicas neste grupo foram: pacientes (CC) com 18,8%, (CT) com 37,6% e (TT) em 43,6% dos indivíduos analisados.

Diferentemente do que foi encontrado na coorte de Pernambuco, o alelo variante (T) mostrou-se associado a maior presença das UM (OR=2.15; IC95%=1.36-3.40; $P=0.001$), e, por conseguinte com a presença do genótipo homozigoto variante (TT) do polimorfismo no gene da *SMAD7* C>T (rs736839) (OR=1.94; IC95%=1.08-3.49; $P=0.029$).

Quanto ao estudo do SNP no gene *SMURF1* C>G (rs219825) no grupo que desenvolveu as UMs, encontramos as seguintes frequências alélicas: o alelo selvagem (C) em 43,3% e o alelo variante (G) em 56,7% dos pacientes. A distribuição genotípica apresentou as seguintes proporções: (CC) 18,3%, (CG) 50,0% e (GG)

31,7%. Em contrapartida, no grupo sem histórico de UMs, a frequência do alelo (C) foi de 61,0% e do alelo variante (G) de 39,0% dos indivíduos. Na análise genotípica as proporções foram: o genótipo (CC) presente em 36,0%; (CG) 50,0% e (GG) em 14,0% nos indivíduos analisados.

Do mesmo modo que o SNP no gene *SMAD7* C>T (rs736839) esteve associado com UM nesta mesma população, foi possível também associar o alelo variante (G) do SNP no gene *SMURF1* C>G (rs219825) (OR=2.05; IC95%=1.36-3.10; $P=0.007$), bem como o genótipo homocigoto variante (GG) (OR=2.86 (1.37-5.98; $P=0.006$) estão relacionados como fatores de risco para a ocorrência das úlceras maleolares.

Tabela 3 – Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825), de acordo com a ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme dos estados de Pernambuco e do Rio de Janeiro.

Polimorfismos	Pernambuco*					Rio de Janeiro**				
	Todos os pacientes (n=331)	UM Presente (n=131)	UM Ausente (n=200)	OR (IC95%)	P-valor†	Todos os pacientes (n=197)	UM Presente (n=108)	UM Ausente (n=89)	OR (IC95%)	P-valor†
<i>SMAD7</i> (rs786839)	No (%)	No (%)	No (%)			No (%)	No (%)	No (%)		
Alelos					0.240					0.001
C	299 (46,4)	107 (42,5)	192 (49,0)			107 (28,4)	47 (21,8)	60 (37,5)	1	
T	345 (53,6)	145 (57,5)	200 (51,0)			269 (71,6)	169 (78,2)	100 (62,5)	2.15 (1.36-3.40)	
Genótipos					0.001					0.029
CC+CT	271 (84,2)	95 (75,4)	176 (89,8)	1		88 (46,8)	43 (39,8)	45 (56,2)	1	
TT	51 (15,8)	31 (24,6)	20 (10,2)	2.87 (1.55-5.31)		100 (53,2)	65 (60,2)	35 (43,8)	1.94 (1.08-3.49)	
<i>SMURF1</i> (rs219825)										
Alelos					0.053					0.007
C	353 (54,3)	127 (49,6)	226 (57,4)			195 (51,3)	90 (43,3)	105 (61,0)	1	
G	297 (45,7)	129 (50,4)	168 (42,6)			185 (48,7)	118 (56,7)	67 (39,0)	2.05 (1.36-3.10)	
Genótipos					0.050					0.006
CC+CG	257 (79,0)	94 (73,4)	163 (82,8)	1		145 (76,3)	71 (68,3)	74 (86,0)	1	
GG	68 (21,0)	34 (26,6)	34 (17,2)	1.73 (1.01-2.97)		45 (23,7)	33 (31,7)	12 (14,0)	2.86 (1.37-5.98)	

* Para a população de Pernambuco, não foi possível realizar a genotipagem em 5 casos e 4 controles, pra o SNP no gene *SMAD7*; e 3 casos e 3 controles para o SNP no gene *SMURF1*;

**Para a população do Rio de Janeiro, não foi possível realizar a genotipagem em 9 controles, para o SNP no gene *SMAD7*; e 4 casos e 3 controles para o SNP no gene *SMURF1*;

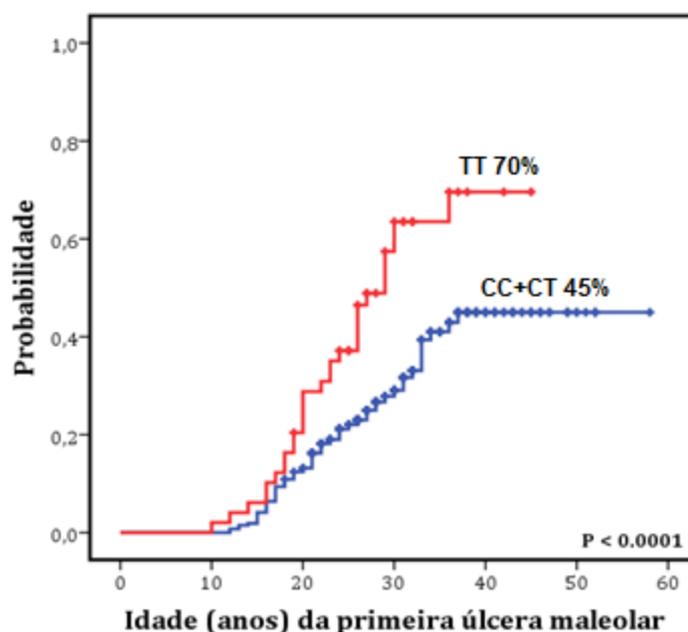
†Os pacientes que não foram genotipados não foram considerados nas análises estatísticas.

5.3. Desfecho da UM em pacientes com AF de acordo com os polimorfismos *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825)

Os resultados posteriormente descritos (figura 10 e figura 11) correspondem apenas aos pacientes que compõem a amostra de Pernambuco. Não foi possível, até a censura do presente estudo obter a data do evento (UM) da coorte do estado do Rio de Janeiro.

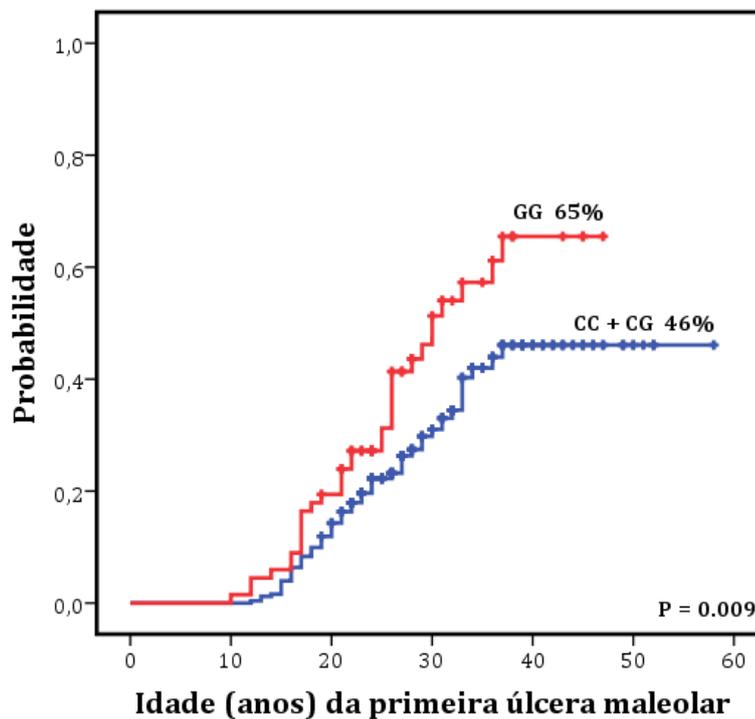
Avaliando o impacto do polimorfismo *SMAD7* C>T (rs736839), no tempo de desenvolvimento das UMs, a média do seguimento para o desfecho foi de 44 anos (IC95%: 42 - 46 anos). Empregando o modelo recessivo de associação, foi observado que os pacientes com genótipo homozigoto variante (TT) apresentaram taxa de desenvolvimento das UMs de 75%, com média de segmento de 40 anos (IC95%: 36 - 45 anos). Em contrapartida, os pacientes com genótipos selvagens e heterozigotos (CC+CT) apresentaram a taxa de desenvolvimento de 45% com média do segmento de 44 anos (IC95%= 42-47 anos) ($P < 0,0001$) (figura 12).

Figura 12 – Probabilidade de surgimento das úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme no estado de Pernambuco, de acordo com o polimorfismo *SMAD7* C>T (rs736839).



Similarmente quando avaliado o impacto do polimorfismo *SMURF1* C>G (rs219825), no tempo de desenvolvimento das UMs, a média do seguimento para o desfecho foi de 44 anos (IC95%= 42- 46 anos). Empregando o modelo recessivo de associação, foi observado que os pacientes com genótipo homocigoto variante (GG) apresentaram taxa de desenvolvimento das UMs de 65%, com média de segmento de 33 anos (IC95%= 30 - 36 anos). Em contrapartida, os pacientes com genótipos selvagens e heterocigotos (CC+CT) apresentaram a taxa de desenvolvimento de 46% com média do segmento de 45 anos (IC95%= 43 - 47 anos) ($P=0,0009$) (figura 13).

Figura 13 – Probabilidade de surgimento das úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme no estado de Pernambuco, de acordo com o polimorfismo *SMURF1* C>G (rs219825).



6. Discussão

O presente estudo é o primeiro a apresentar o perfil clínico-laboratorial de pacientes com anemia falciforme que desenvolveram úlceras maleolares, em duas coortes independentes no Brasil. A partir da caracterização das amostras, foi possível investigar a associação de polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825) que possivelmente estão envolvidos na fisiopatologia da UM e os resultados foram reprodutíveis nas duas coortes avaliadas.

Nas duas populações, as frequências do evento UM foram semelhantes. Em Pernambuco, a frequência encontrada foi de 18,5% acometendo mais os indivíduos do gênero masculino (73/131 pacientes; 55,7%), e no Rio de Janeiro, a frequência foi de 21,2%, entretanto prevalente no gênero feminino (56/108 pacientes; 51,9%). A diferença nas frequências entre os gêneros observada nas amostras não pode ser relevante, uma vez que não utilizamos amostras consecutivas, e fatores interferentes como acesso aos prontuários e assiduidade dos pacientes às consultas ambulatoriais, devem ser levados em consideração.

Os dados de prevalência da UM nas duas populações estão de acordo do que é estimado em países da América do Sul (Serjeant et al., 2005; Minniti et al., 2010; Madu et al., 2013). A distribuição geográfica para a ocorrência das UMs é variável sofrendo influência das condições climáticas e socioeconômicas. Estudos em pacientes com AF (HbSS) realizados em áreas de clima tropical, mostraram uma frequência de desenvolvimento das UMs variando de 24-75%, em contrapartida, estudos realizados em áreas de clima temperado mostram uma frequência de 8-10% (Alleyne et al., 1977; Serjeant et al., 2005; Minniti et al., 2010; Madu et al., 2013). No Brasil não há uma estimativa precisa quanto a frequência das principais complicações

clínicas da AF, dentre elas as UMs. Isso decorre devido à escassez de estudos multicêntricos bem como da realização de pesquisas envolvendo um número limitado de pacientes avaliados em centros isolados. Isso ressalta a importância do desenvolvimento de estudos multicêntricos para melhor expressar o perfil clínico-laboratorial dos pacientes com AF no Brasil, contribuindo assim com o desenvolvimento de futuros estudos de associação do tipo genótipo-fenótipo.

Corroborando com os dados que a literatura relata em diversas populações, a mediana da idade para o surgimento da primeira UM nos pacientes de Pernambuco, foi de 21 anos. Os estudos apontam que as lesões são mais frequentes em adultos HbSS, surgindo no período de 10 a 25 anos de idade, sendo mais difíceis de surgir após os 30 anos de vida (Serjeant *et al.*, 2005; Powars *et al.*, 2005). A hipótese para a raridade de úlceras espontâneas em pacientes pediátricos é de que a princípio a rede vascular tem capacidade de tolerar oclusões sem que o tecido epitelial sofra hipóxia. Com o passar dos anos, a ocorrência de sucessivas oclusões e danos recorrentes ao endotélio o organismo passa a não mais tolerar essas injúrias culminando nos danos teciduais (Powars *et al.*, 2005; Minniti *et al.*, 2013).

Nas nossas análises não encontramos correlação da combinação haplotípica CAR/CAR com a ocorrência das úlceras maleolares na coorte de Pernambuco ($P=1.000$) e também na coorte do Rio de Janeiro ($P=0.654$). A combinação haplotípica CAR/CAR foi a mais presente nas duas coortes, com frequência de aproximadamente 50% dos pacientes com AF, corroborando com dados da literatura e assim demonstrando a prevalência do haplótipo relacionado com o pior prognóstico da AF (Bezerra *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2012; Okumura *et al.*, 2012; Domingos *et al.*, 2014).

Outro modulador genético da AF analisado foi a co-herança com a alfa talassemia. Na população de Pernambuco ($P=0.243$) e no Rio de Janeiro ($P=1.000$)

não foi possível realizar essa associação com o surgimento, ou como fator de proteção ao desenvolvimento da UM. Dados controversos são encontrados em diferentes estudos, que associam a alfa talassemia como sendo um importante fator de proteção às complicações hemolíticas da doença falciforme (como UMs, Priapismo e o AVC), por diminuir a concentração da hemoglobina intra-eritrocitária. (Higgs et al., 1982; Steinberg et al., 1984; Steinberg, 2005; Kato et al., 2007; Pandey et al., 2011).

Diante da diversidade fenotípica que encontramos nos pacientes com AF, se faz necessário investigar outros moduladores do curso clínico da doença, além dos marcadores moleculares clássicos. No presente estudo, investigamos polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825), que já haviam sido associados com o desenvolvimento de UM em pacientes com AF nos Estados Unidos (Nolan et al., 2006). Os respectivos genes são responsáveis pela codificação de duas proteínas inibitórias *SMAD7* e *SMURF1* essenciais no controle da via de fosforilação do TGF- β . A via de sinalização do TGF- β vem sendo estudada como a principal atuante no processo de remodelagem tecidual que envolve a fisiopatologia das úlceras gástricas e de pele (Massangué, 1998; Pastar et al., 2010; Poniatowski et al., 2015).

No presente trabalho direcionamos nossa investigação para entender a contribuição dos polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825), no surgimento das úlceras maleolares em pacientes com AF, ressaltando a importância do papel de cada proteína na via de sinalização do TGF- β . Diversas pesquisas com polimorfismos em genes *SMADs* e *SMURFs* foram realizadas com a finalidade de encontrar possíveis marcadores moleculares que estariam envolvidos em patologias como o câncer, úlceras gástricas e distúrbios fibróticos (Jude et al., 2001; Scollen et al., 2011; Pastar et al., 2010). Sabendo-se da importância do correto

funcionamento da via de sinalização do TGF- β , nos processos de cicatrização, Pastar e colaboradores (2010) investigaram a expressão dos genes das R-SMADS (*SMAD 2* e *3*) e I-SMAD (*SMAD7*) em biópsias de úlceras venosas ativas. Os resultados mostraram que nos processos de cicatrização tardios há uma significativa expressão de *SMAD7* e diminuição da expressão das *SMADs 2 e 3*, com conseqüente diminuição da expressão dos receptores para o TGF- β . Sendo assim, se esta via está desregulada, não ocorrerá a ativação de genes para reepitalização, crescimento celular e angiogênese (Pastar et al., 2010).

Recentemente, estudos de meta-análise mostraram que os polimorfismos intrônicos rs4939827 e rs4464148 no gene *SMAD7* foram associados como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de cólon retal em populações com pacientes caucasianos e asiáticos (Yao et al., 2015). Resultados similares já haviam sido encontrados em pacientes caucasianos por Slattery e colaboradores (2010), descrevendo uma associação com o rs12953717 do *SMAD7*, o qual apresenta um risco de 1,38 vezes para o desenvolvimento do câncer retal (Slattery et al., 2010). A hipótese apontada por estes estudos ressalta o papel dos polimorfismos localizados nas regiões intrônicas na regulação do processo de *splicing* alternativo e da expressão gênica (Slattery et al., 2010).

Kwei e colaboradores (2011) ao analisar a expressão da *SMURF1* em biópsias de câncer pancreático, verificaram que os pacientes que tinham alto índice de invasão celular apresentavam altos níveis de expressão da *SMURF1*. Como forma de investigar uma possível relação, utilizam miRNA (micro RNA) na cultura das células obtidas das biópsias para silenciar o gene do *SMURF1*, e verificaram que há diminuição da proliferação destas células (Kwei et al., 2011). Assim, a busca por novos marcadores moleculares nas proteínas inibidoras da via do TGF- β (*SMAD7* e *SMURF1*) se faz um alvo lógico na associação com complicações músculo-cutâneas na AF.

O primeiro trabalho que investigou associação de polimorfismos na via do TGF- β com úlceras de membros inferiores na AF, foi realizado por Nolan e colaboradores (2006). Foi um estudo multicêntrico com pacientes portadores de anemia falciforme nos Estados Unidos em uma amostra de 243 casos com AF que possuíam histórico de UM e 516 controles sem UM. Os resultados mostraram que os polimorfismos localizados nos genes da via do TGF- β /BMP6 (*TGFBR2*, *TFFBR3*, *SMAD7*, *SMURF1*, *MAP3K7*), têm associação com o surgimento de úlceras maleolares (Nolan et al., 2006).

A taxa de desenvolvimento das úlceras foi de 77% nos pacientes que herdaram em homozigose o genótipo variante (CC) para *SMAD7* C>T (rs736839) bem como 65% nos pacientes que herdaram em homozigose o genótipo variante (GG) para o *SMURF1* C>G (rs219825). Nossos dados apontam para o envolvimento destes SNPs como fatores de risco na ocorrência e/ou como contribuintes no processo de cicatrização tardio das UMs nos pacientes com AF. Entretanto, ainda não podemos afirmar de que forma esses polimorfismos estariam regulando a expressão dos genes e interferindo na função destas proteínas, mas diante do que conhecemos da via do

TGF- β , se proteínas inibitórias estão sendo expressas em grande quantidade, não ocorrerá a formação do complexo SMAD2/SMAD3 e conseqüentemente, haverá diminuição na expressão dos receptores TGF β R1 e TGF β R2 para a citocina inativando a expressão de genes alvo (Tang L-x et al., 2012).

Diante da importância do papel do TGF- β no processo de cicatrização, é necessário um maior entendimento do balanço da expressão gênica dos reguladores da via principalmente nos pacientes com anemia falciforme, uma vez que o processo de cicatrização das úlceras é agravado não apenas pelo quadro clínico dos pacientes, mas também dos fatores ambientais e socioeconômicos que envolvem a doença (Pastar et al., 2010; Minniti et al., 2013). Embora os dois polimorfismos avaliados neste estudo tenham potencial efeito nos processos de surgimento de úlceras maleolares, a avaliação funcional dos níveis de transcritos e das proteínas codificadas da via do TGF- β também são importantes para entendermos o real impacto dessas variantes na modulação dos fenótipos apresentados por pacientes AF com úlcera maleolar.

7. Conclusões

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- Os polimorfismos nos genes *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825) estão relacionados com a ocorrência das úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme nas duas coortes avaliadas;
- Os pacientes com anemia falciforme que possuem os genótipos variantes em homozigose para os polimorfismos *SMAD7* C>T (rs736839) e *SMURF1* C>G (rs219825), apresentam uma maior taxa de desenvolvimento de úlceras maleolares quando comparados com os pacientes com genótipo selvagens e heterozigotos.

8. Referências Bibliográficas

- Adewoye AH, Nolan GV, Ma Q, et al. (2006) Association of Polymorphisms of IGF1R and Genes in the Transforming Growth Factor- β /Bone Morphogenetic Protein Pathway with Bacteremia in Sickle Cell Anemia. *Genetics of Bacteremia in Sickle Cell Anemia* 43:593-598.
- Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin C, Sebastiani P, Chui DHKC, and Steinberg MH (2011) Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 118: 19-27.
- Alleyne SI, Wint E, Sargeant GR (1977) Social effects of leg ulceration in sickle cell anemia. *Southern Medical Journal*, 70 (2): 213-214.
- Applied Biosystems (2014) Real Time PCR Systems: TaqMan® SNP Genotyping Assays. User guide. Life Technologies Corporation Disponível em: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_man.pdf>. Acesso em: 30 de abril de 2015.
- Arno AI, Gauglitz GG, Barret JP, Jeschke MG (2014) New Molecular medicine-based scar management strategies. *Burns* 40:539-551.
- Attisano L and Wrana J (1998) Mads and Smads in TGF- β signaling. *Cell Regulation* 10:188-194.
- Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV (1998) Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Europe PMC* 66(8):1014-1020.
- Balding DJ (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Reviews-Genetics* 7:781-791.
- Ballas SK and Mohandas N (2004) Sickle Red Cell Microrheology and Sickle Blood Rheology. *Microcirculation*, 11: 209–225.
- Ballas SK and Marcolina MJ (2005) Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* 46: 105–110.
- Bandeira FM, Santos MN, Bezerra MA, Gomes YM, Araújo AS, Braga MC, et al (2008) Family screening for HBB*S gene and detection of new cases of sickle cell trait in Northeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 42:234-41
- Bandeira ICJ, Rocha LBS, Barbosa MC, Elias DBD, Queiroz JAN, Freitas MVC, Gonçalves RP (2014) Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB S haplotype. *Cytokine* 65:217–221.
- Bezerra MA, Santos MN, Araújo AS, Gomes YM, Abath FG, Bandeira FG (2007) Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha globin genes in

neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. *Hemoglobin*. 31(1):83-8.

- Bhatnagar P, Barron-Casella E, Bean CJ, et al (2013) Genome-Wide Meta-Analysis of Systolic Blood Pressure in Children with Sickle Cell Disease. *PlosOne*. 8(9): e74193.
- Bowers AS, Reid HR, Greenidge A, Landis C, Reid M (2013) Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. *PLOS ONE* 8:e68929.
- Brasil. Ministério da Saúde, Portaria nº 872 de 12 de Novembro de 2002. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas-Doença Falciforme-Hidroxiuréia.
- Cançado RD, Jesus JA (2007) A doença falciforme no Brasil. *Rev Br Hematol Hemoter* 29(3): 203-206.
- Chen G, Chuxia D, Yi-Ping L (2012) TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.* 8(2): 272-288.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A (1998) A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Research* 8:1229-1231.
- Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF (2009) Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 33:1-16.
- Davis LG, Dibner MD, Battey JF (1986) *Basic Method in Molecular Biology*. 1ª Londres: Elsevier 388p.
- Dal-Ri Lindenau J (2009) Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul [trabalho de conclusão de curso] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso Ciências Biológicas ênfase Molecular, Celular e Funcional, Departamento de Genética.
- Delaney KM, Axelrod KC, Buscetta A, Hassell KL, Adams-Graves PE, et al. (2013) Leg ulcers in sickle cell disease: current patterns and practices. *Hemoglobin*, 37:325-332.
- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochete J (1993) Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and $\alpha\alpha^{anti\ 3.7}$ by enzymatic amplification analysis. *Br J of Haematol* 83: 105-11.
- Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG, Araújo AS, Lucena-Araujo AR, Bezerra MA (2014) Influence of the β^s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol* 93:1123-29.

- Doss CGP, Nagasundaram N, Tanwar H(2012) Predicting the Impact of Deleterious Single Point Mutations in SMAD Gene Family Using Structural Bioinformatics Approach. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* 4: 103-115.
- Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz TV, Stiles JK (2009) Sickle cell disease in the post genomic era: a monogenic disease with a polygenic phenotype. *Genomics Insights* 30(2):23-48.
- Ebisawa T, Fukuch M, Murakam G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, and Miyazono K (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through smad7 and induces receptor degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 12477-12480.
- Fens HM, Larkin KS, Oronsky B, Scicinski J, Morris CR, Kuypers FA (2014) The capacity of red blood cells to reduce nitrite determines nitric oxide generation under hypoxic conditions. *PlosOne* 9 (7): 1-17.
- Figueiredo MS, Kerbauy J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, Stoming T, Costa FF (1996) Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol.* 53(2):72-6.
- Filho ILS, Ribeiro GS, Moura PG, Vechi ML, Cavalcante CA, Andrada-Serpa MJ (2012) Sickle cell disease: Acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 34(3):196-201.
- Fleury MK (2007) Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 39(2): 89-93.
- Frenette PS and Atweh GF (2007) Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of Clinical Investigation* 17:850–858.
- Galarneun G, Coady S, Garrett ME et al. (2013) Gene-centric association study of acute chest syndrome and painful crisis in sickle cell disease patients. *Blood.* 122 (3): 434-442.
- Hassan SM, Muslahi MAI, Riyami MAI, Bakker E, Hartevelde CL and Giordano PC (2014) Sickle cell anemia and α -thalassemia: A modulating factor in homozygous HbS/S patients in Oman. *European Journal of Medical Genetics* 57: 603–606.
- Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, et al (1982) The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med* 306:1441-1446.
- Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJM and Ferguson MW (2001) Transforming growth factor- β 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine* 19:440–447.

- Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, Brennan Marie-Luise, Hazen SL, Gladwin MT (2005) Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *British Journal of Haematology* 130: 943–953.
- Kato GJ, McGowan V, Machado RF et al. (2006) Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* 107: 2279-2285.
- Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews* 21:37-47.
- Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, and Gladwin MT (2009) Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American Journal of Hematology* 84: 618-625.
- Kim HT (2007) Cumulative Incidence in Competing Risks Data and Competing Risks Regression Analysis. *Clin Cancer Res.* 13(2): 559-565.
- Kim Byung-Chul, Kim TH, Park SH, et al. (2003) Fibroblasts From Chronic Wounds Show Altered TGF- β Signaling and Decreased TGF- β Type II Receptor Expression. *Journal of Cellular Physiology* 195:331-336.
- Kwei KA, Shain AH, Bair R , Montgomery K , Karikari CA , Matt van de Rijn, Hidalgo M, Maitra A, et al (2011) SMURF1 Amplification Promotes Invasiveness in Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* 6(8): e23924
- Ladizinski B, Bazakas A, Mistry N, Alavi A, Sibbald RG, Salcido R (2012) Sickle cell disease and leg ulcers. *Advances in Skin & Wound Care* 25: 420-428.
- Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF (2009) Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *Journal of Leukocyte Biology* 85: 235-242.
- Lapouniéroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lob  M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R (1992) A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Human Genetics* 89: 333-337.
- Lawrence, DA (1995) Transforming growth factor-beta: an overview. *Kidney Int Suppl.* 49: 19-23.
- Lewis CM (2002) Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Briefings In Bioinformatics* 3(2): 146-153.
- Liu RM and Pravia GKA (2010) Oxidative stress and glutathione in TGF- β mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 48: 1-37.

- Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JA, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad ST, et al (2005) Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública/Ministério da Saúde* 21(4):1287-90.
- Manwani D and Frenette PS (2013) Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. *Blood* 122: 3892-3898. Mikobi TM Tshilobo PL, Aloni NM et al. (2015) Correlation between the Lactate Dehydrogenase Levels with Laboratory Variables in the Clinical Severity of Sickle Cell Anemia in Congolese Patients. *PlosOne* 6:1-10.
- Martí-Carvajal AJ, Knight-Madden JM, Martínez-Zapata MJ (2014) Interventions for treating leg ulcers in people with sickle cell disease (Review). *The Cochrane Library* 12:1-54.
- Massagué J (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753–91.
- Massagué J (2000) How cells read TGF- β signals. *Nature Reviews-Molecular Cell Biology* 1: 169-178.
- Massagué J and Xi Q (2012) TGF- β control of stem cell differentiation genes. *FEBS Letters* 586: 1953-1958. Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK (2010) Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol* 85(10).
- Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg Ulcers in Sickle Cell Disease. *American journal of hematology.* 85 (10):831-833.
- Minniti CP, Delaney Kara-Marie H, Gorbach AM, et al (2013) Vasculopathy, inflammation and blood flow in leg ulcers of patients with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, 89(1):1-6.
- Mtatiro SN, Singh T, Rooks H, et al (2014) Genome Wide Association Study of Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia in Tanzania. *PlosOne* 9(11):e111464.
- Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, et al. (2006) Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *British Journal Haematology* 133(5): 570–578.
- Nourai M, Lee JS, Zhang Y, Kanas T, Zhao X, Xiong Z, et al. (2013) The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Hematologica* 98: 464-472.
- Okpala I, Daniel Y, Haynes P, Odoemene D, Goldman J (2002) Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. *Eur J Haematol.* 69(3):135-44.
- Okumura JV, Lobo CLC, Bonini-Domingos CR (2012) Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 35(1):71-72.

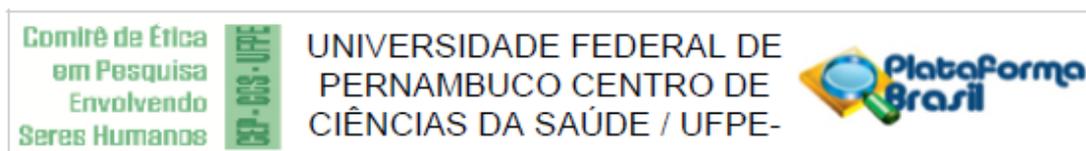
- Pacheco AG & Moraes MO (2009) Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease Markers* 27:173-186.
- Pagnier J, Mears G, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D (1982) Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (81): 1771-1773.
- Paladino SF (2007) Úlceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 29(3): 288-290.
- Pandey S, Pandey S, Mishra RM, Sharma M, Saxena R (2011) Genotypic influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. *Korean J Hematol.* 46(3):192-195.
- Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M (2010) Attenuation of the Transforming Growth Factor β -Signaling Pathway in Chronic Venous Ulcers. *Mol Med* 16: 92-101.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP (1994) "Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death." *N Engl J Med* 330(23): 1639-44.
- Ramirez H, Patel SB, Pastar I (2013) The role of TGF- β signaling wound epithelization. *Advances In Wound Care* 3(7): 482-491.
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT (2010) Sickle-cell disease. *Lancet* 376 (9757): 2018-2031.
- Rieder RF, Safaya S, Gillette P, Fryd S, Hsu H, Adams JG , Steinberg MH (1991) Effect of P-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *Am J Hemato*, 36:184-189.
- Poniatowski AA, Wojdasiewicz P, Gasik R, and Szukiewicz D (2015) Transforming growth factor beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators of Inflammation*.
- Powars DR, Chan LS, Hiti A, et al (2005) Outcome of Sickle Cell Anemia. *Medicine*, 84(6): 363-376. Rubtsov YP and Rudensky AY (2007) TGF- β signalling in control of T-cell mediated self-reactivity. *Nature Reviews | Immunology* 7: 443-453.
- Rusanova I, Cossio G, Moreno B, Javier PF, De Borace RG, Perea M, et al (2011) β -Globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. *Am J Hum Biol* 23:377-80.
- Samanta D, Datta PK (2012) Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Frontiers in Bioscience* 17:1281-1293.
- Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH (2005) Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nature Genetics* 37(4): 435-440.

- Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A (2005) Leg Ulceration in Sickle Cell Disease: Medieval Medicine in a Modern World. *Hematol Oncol Clin N Am* 19:943–956.
- Scollen S, Luccarini C, Baynes C, et al. (2011) TGF- β Signaling Pathway and Breast Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20:1112-1119.
- Shah KN, Racine J, Jones LC, Aaron RK (2015) Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis. *Curr Rev Musculoskelet Med* (8):201–209.
- Shi Y & Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- β Signaling Review from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell*, 113, 685–700.
- Silva MAL, Friedrisch JR, Bittar CM, Urnau M, Merzoni J, Valim VS, et al. (2014) β -Globin Gene Cluster Haplotypes and Clinical Severity in Sickle Cell Anemia Patients in Southern Brazil. *Open Journal of Blood Diseases* (4):16-23.
- Slattery ML, Herrick J, Curtin K, Samowitz W, Wolff RK, Caan BJ, Duggan D, Potter JD, Peters U (2010) Increased Risk of Colon Cancer Associated with a Genetic Polymorphism of SMAD7. *Cancer Res.* 70(4): 1479–1485.
- Soares AC, Samico IC, Araújo AS, Bezerra MA, Hatzlhofer BL (2014) Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. *Rev Br Hematol Hemoter* 36(4):250-5.
- Steinberg MH, Rosenstock W, Coleman MB, Adams JG, Platica O, Cedeno M, Rieder RF, Wilson JT, Milner P, West S (1984) Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. *Blood* 63(6): 1353-1360.
- Steinberg MH (1999) Management of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 340:1021–1030.
- Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anemia. *Br J Haematol* 129:465–481.
- Steinberg MH (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approach. *Sci World J* 8:1295-34.
- Steinberg MH (2008) SNPing away at sickle cell pathophysiology. *Blood* 111(12): 5420–5421.
- Steinberg MH, Sebastiani P (2012) Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol* 87:795-803.
- Steinberg MH, McCarthy WF, Castro O, et al., and Investigators of the Multicente Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia and MSH Patients' Follow-up (2013) The Risks and Benefits of Long-term Use of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia: A 17.5 Year Follow-Up. *Am J Hematol* 85: 403–408.

- Stuart MJ and Nagel RL (2004) "Sickle-cell disease." *Lancet* 364(9442): 1343-60
- Suzuki C, Gyo M, Minoru F, et al. (2002) Smurf1 Regulates the Inhibitory Activity of Smad7 by Targeting Smad7 to the Plasma Membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 39919–39925.
- Tang L-x, He R-h, Yang G, Tan J-j, Zhou L, et al. (2012) Asiatic Acid Inhibits Liver Fibrosis by Blocking TGF-beta/Smad Signaling In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE* 7(2): e31350.
- Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, Higuchi K, Tarnawski AS (2005) TGF-b Signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing. *Journal of Physiology And Pharmacology* 56:3-13.
- Taylor JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2008) Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS ONE* 3: e2095.
- Toma S, Tenorio M, Oakley M, Thein SL, and Clark BE (2014) Two Novel Mutations (*HBG1*: c.-250C>T and *HBG2*: c.-250C>T) Associated With Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. *Hemoglobin*, 38:67-69.
- Weiss A and Attisano L (2013) The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway. *Wiley Periodicals* 2: 47-63.
- Werner S & Grose R (2003) Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev* 83:835-870.
- Wrighton KH, Lian X, Feng Xin-Hua (2009) Phospho-control of TGF- β superfamily signaling, *Cell Research* 19:8-20.
- Yao K, Hua L, Wei L, Meng J, Hu J (2015) Correlation Between CASC8, SMAD7 Polymorphisms and the Susceptibility to Colorectal Cancer. An Updated Meta-Analysis Based on GWAS Results. *Medicine (Baltimore)*, 94(46): e1884.
- Xu P, Liu J, and Derynck R (2012) Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Lett* 586(14): 1871–1884.
- Xu Z & Taylor JA (2009) SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Research* 37:600-605.
- Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS (2016) Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *BLOOD*, 127(7): 801-809.

9. Anexos

ANEXO A — Parecer Substanciado Do Comitê De Ética Em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CCS-UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS NOS GENES KLOTHO, TNF-alfa, TGF-beta E BMP6 COM O DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME

Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05094213.6.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 510.517

Data da Relatoria: 15/01/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

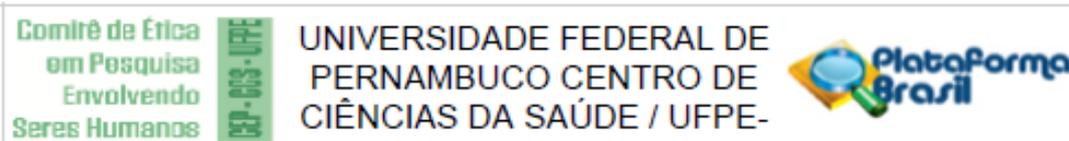
Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

Sem recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.



Continuação do Parecer: 510.517

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

RECIFE, 14 de Janeiro de 2014

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)

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

10. Currículo Lattes

Luana Priscilla Laranjeira Prado

Dados pessoais

Nome Luana Priscilla Laranjeira Prado
Filiação Luiz Carlos Laranjeira e Ana Patricia Moraes Laranjeira
Nascimento 19/12/1988 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6505724 SDS - PE - 21/01/2014
CPF 084.049.544-70

Formação acadêmica/titulação

- 2014** Mestrado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Influência de polimorfismos dos genes *SMAD7* e *SMURF1* na ocorrência de úlceras maleolares em pacientes com anemia falciforme

 Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
 Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: Anemia Falciforme, Úlcera Maleolar
- 2010 - 2014** Graduação em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Formação complementar

- 2012** Saúde Baseada em Evidências. (Carga horária: 150h).
 Hospital Sírio-Libanês, SIRIO-LIBANÊS, Sao Paulo, Brasil
Palavras-chave: Saúde coletiva, Métodos Estatísticos de Análise, Desenvolvimento de Projetos Científicos
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Curso de Imuno-hematologia - Módulo II. (Carga horária: 20h).
 Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
Palavras-chave: Imuno-hematologia, Rotina laboratorial
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Genoma, Proteoma e Universo Celular. (Carga horária: 44h).
 Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, FUNDHERP, Ribeirão Preto, Brasil
- 2013 - 2013** Extensão universitária em PCR em Tempo Real:Princípios Básicos e Aplicações. (Carga horária: 60h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. (Carga horária: 30h).
 Instituto Nacional de Câncer, INCA, Rio De Janeiro, Brasil
Palavras-chave: Câncer, Epidemiologia do câncer
- 2009 - 2009** Química Med. no Desenvol. de Anti-inflamatórios. . (Carga horária: 4h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2009 - 2009	Celiac Day no Brasil. (Carga horária: 9h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2009 - 2009	Extensão universitária em Histotecnologia e Noções de Citologia Oncótica. (Carga horária: 90h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2009 - 2009	Bases Moleculares do Câncer. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE
2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2012 - 2013	Vínculo: Voluntária, Enquadramento funcional: Monitora, Carga horária: 12, Regime: Parcial
2012 - 2013	Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial
2010 - 2011	Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

03/2010 - 08/2011 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos
Linhas de pesquisa:
Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme. Atividade antitumoral in vivo, Farmacologia da dor e inflamação.

3. Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas - UFPE

Vínculo institucional

2009 - 2011	Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Estágio, Carga horária: 20, Regime: Parcial
--------------------	--

Linhas de pesquisa

1. Atividade antitumoral in vivo

Objetivos: Avaliação da atividade antitumoral in vivo de produtos naturais e sintéticos
Áreas do conhecimento: Farmacologia
2. Farmacologia da dor e inflamação

Objetivos: Avaliar as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas de produtos naturais e produtos sintéticos.

Áreas do conhecimento: Farmacologia

3. Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme.

Objetivos: O objetivo geral é determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade de manifestações clínicas da anemia falciforme, como: o priapismo, a formação de úlceras maleolares, e o acidente vascular cerebral. Tendo como finalidade, contribuir para o melhoramento do prognóstico da anemia falciforme e do tratamento durante o acompanhamento clínico.

Palavras-chave: Moduladores genéticos, Anemia Falciforme, Manifestações clínicas

Áreas do conhecimento: Biologia Molecular, Genética Humana e Médica

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico, Atividades profissionais, científicas e técnicas

Projetos

Projetos de pesquisa 2014 – Atual – AVALIAÇÃO DE GENES DA VIA DO TGF-beta NO DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERA DE MEMBROS INFERIORES EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Descrição: A úlcera de membros inferiores é uma complicação crônica, bastante frequente e de difícil cicatrização na anemia falciforme. Os fatores que predisõem os pacientes falciformes a essa complicação não estão bem estabelecidos, embora seu desenvolvimento sugira o papel da hemólise. Existe, portanto, a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precocemente possível na nossa população, de forma que medidas preventivas poderão ser tomadas evitando que os pacientes sofram complicações futuras e intervenções cirúrgicas. A identificação de padrões biológicos que influenciem na modulação fenotípica, é muito útil e de grande impacto na melhoria da sobrevida e da qualidade de vida dos doentes. O TGF- β é uma citocina pleiotrópica com atuação importante no curso patológico de úlceras gástricas e de pele. Regula o processo de cicatrização, angiogênese, reepitelização, inflamação local e formação de granulação do tecido. Espera-se que com o presente projeto, seja possível entender como o papel de genes envolvidos na via de sinalização do TGF- β ; estão envolvidos com o desenvolvimento de complicações vasculares na anemia falciforme, como as úlceras maleolares. Com estas informações, será possível entender a evolução inflamatória e crônica das úlceras, contribuindo com futuros métodos de tratamento, além de tornar eficiente a triagem de pacientes que evoluem de forma grave nos sintomas secundários da anemia falciforme.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Luana Priscilla Laranjeira Prado; Marcos Andre Cavalcanti Bezerra (Responsável); Antonio Roberto Lucena-Araujo

2013 - Atual "Investigação de Moduladores Genéticos da Úlcera de Membros Inferiores e Osteonecrose em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme "

Descrição: A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil, ocorrendo, predominantemente entre afro-descendentes. A causa da doença é uma mutação de ponto (GAG - GTG) no gene da globina beta da hemoglobina (Hb), originando uma Hb anormal, a HbS, ao invés da Hb normal (HbA). Quando desoxigenada, HbS polimeriza, formando estruturas filamentosas (polímeros de HbS desoxigenada) que se depositam nas hemácias, modificando sua forma e tornando-as falciformes. As células rígidas, conhecidas como células em forma de foice, são responsáveis pela oclusão vascular, episódios de dor e lesão de órgãos alvos que representam os fenômenos principais dessa doença, tais como crises algidas; crises hemolíticas; síndrome torácica aguda; sequestro esplênico; retinopatia; insuficiência renal crônica; autoesplenectomia; priapismo, acidente vascular cerebral, osteonecrose e úlceras de membros inferiores, entre outros. A úlcera de membros inferiores é uma complicação frequente na doença falciforme e ocorre devido a vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos, apresentando cicatrização lenta e alta taxa de recorrência. Ocorre entre 8% a 10% dos pacientes homocigotos, atingindo percentual maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A osteonecrose também é uma das complicações mais frequentes na anemia falciforme. Estas lesões decorrem da necrose avascular da medula óssea e as dores refletem provavelmente o aumento da pressão intramedular associada ao processo inflamatório. Na osteonecrose ocorre à degeneração progressiva dos ossos e destruição articular da cartilagem, sendo uma importante causa de morbidade na doença falciforme. Sendo a anemia falciforme uma doença

multifatorial, a identificação de variáveis genéticas podem ajudar a definir mecanismos fisiopatológicos críticos não evidentes e ser útil à conduta clínica dos médicos. O objetivo principal deste trabalho é determinar as bases moleculares que possam influenciar no desenvolvimento de úlceras de membros inferiores e osteonecrose em nossa população de pacientes portadores de anemia falciforme acompanhados no Hospital da Fundação HEMOPE. A identificação de polimorfismos genéticos que possam estar associados às úlceras e lesões osteoarticulares na anemia falciforme fornecerá subsídios para um melhor atendimento e acompanhamento médico, e conseqüentemente detectar precocemente lesões que possam causar sequelas graves ou afetar a qualidade de vida desses pacientes.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (4); Mestrado acadêmico (5); Doutorado (2);

Integrantes: Luana Priscilla Laranjeira Prado; Aderson da Silva Araújo; Kleber Y Fertrin; Igor de Farias Domingos; Fernanda Silva Medeiros; Diego Arruda Falcão; Marcos Andre Cavalcanti Bezerra (Responsável); Betânia Lucena D. Hatzlhofer; Isabela Farias; Diego A P Martins; Luydson Richardson Silva Vasconcelos ; Patrícia Moura; Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti ; Antonio Roberto Lucena-Araujo ; Rayssa Leal Borges de Medeiros; Manuela Andrade Costa; Mariana Barros Souto de Souza

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2012 - 2012 Associação de Polimorfismo no gene TNF-alfa com as manifestações clínicas da anemia falciforme.

Descrição: A anemia falciforme (AF) é caracterizada por manifestações clínicas graves como vaso-oclusão, crises dolorosas, úlcera de perna, priapismo e AVC. Complicações neurológicas ocorrem em até 25% dos pacientes com anemia falciforme. Estudos mostram que 28 a 38% dos pacientes com AF apresentam histórico de priapismo. Os fatores que predispõem os pacientes com anemia falciforme a essas complicações não estão bem estabelecidos. Existe, portanto, a necessidade de identificar marcadores que possam distinguir pacientes com essa complicação o mais precoce possível. Estudos demonstram que pacientes falciformes apresentam níveis plasmáticos elevados de TNF- α . O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que favorece a fagocitose, o recrutamento de neutrófilos e a expressão da molécula de adesão VCAM-1. Estudos in vitro mostraram que o TNF- α aumenta à aderência de hemácias falcizadas as células endoteliais dos vasos. O objetivo geral desse trabalho é determinar as bases moleculares que possam influenciar na variabilidade de manifestações clínicas da anemia falciforme em pacientes pediátricos,

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Luana Priscilla Laranjeira Prado; Marcos Andre Cavalcanti Bezerra (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2012 - Atual Associação de Polimorfismos nos Genes Klotho e TNF-alfa com o Desenvolvimento de Úlceras Maleolares em Pacientes Portadores de Anemia Falciforme

Descrição: Considerando a anemia falciforme como uma doença inflamatória crônica. O polimorfismo na posição -308 do gene que codifica TNF-alfa resultando na síntese aumentada desta citocina pró-inflamatória, e os polimorfismos no gene Klotho (KL), podem ser um dos fatores responsáveis por uma possível clínica exacerbada dos fenômenos inflamatórios em pacientes falciformes que desenvolvem úlceras maleolares. A identificação destes polimorfismos pode ajudar a identificar pacientes com riscos de complicações graves, antes que estas possam ocorrer. O presente trabalho visa investigar as bases moleculares e avaliar o impacto clínico destas variantes genéticas em pacientes com úlceras de membros inferiores portadores de anemia falciforme, acompanhados no serviço de Hematologia e Hemoterapia da Fundação HEMOPE.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Luana Priscilla Laranjeira Prado; Betânia Lucena T. B. Domingues; Igor de Farias Domingos; Diego Arruda Falcão; Raysa Samanta Moraes Laranjeira; Marcos Andre Cavalcanti Bezerra (Responsável)

2010 - 2012 Fatores Genéticos Moduladores da Gravidade Clínica da Anemia Falciforme

Descrição: A anemia falciforme (AF) é caracterizada por manifestações clínicas graves como vaso-oclusão, crises dolorosas, úlcera de perna, priapismo e AVC. Complicações neurológicas ocorrem em até 25% dos pacientes com anemia falciforme. Estudos mostram que 28 a 38% dos pacientes com AF apresentam histórico de priapismo. Os fatores que predispõem os pacientes com anemia falciforme a essas complicações não estão bem estabelecidos. Existe, portanto, a necessidade de identificar

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

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (7); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

Integrantes: Luana Priscilla Laranjeira Prado; Aderson da Silva Araújo; Kleber Y Fertrin; Marília Siqueira A. R. Pinto; Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer; Antonio Carlos de Freitas; Igor de Farias Domingos; Nara Barbosa Araújo; Fernando Baltar Oliveira; Fernanda Silva Medeiros; Ohanna Azevedo Hirata; Tauane Mathias Pereira; Diego Arruda Falcão; Raysa Samanta Moraes Laranjeira; Marcos Andre Cavalcanti Bezerra (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ

2010 - 2011 Avaliação da atividade antiartrítica da b-lapachona e do complexo de inclusão da b-lapachona em ciclodextrina

Descrição: O projeto é original e inovador, pois trata do estudo das propriedades anti-inflamatórias de uma molécula com propriedades terapêuticas e toxicológicas já estudadas. A b-lapachona poderá ser uma alternativa terapêutica para tratamento de processos inflamatórios crônicos. Além disso, por se tratar de uma substância de toxicologia já conhecida, poderá diminuir o tempo de pesquisa pré-clínica deste agente.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Luana Priscilla Laranjeira Prado; Teresinha Gonçalves da Silva (Responsável)

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Hematologia
3. Genética Humana e Médica
4. Antiinflamatórios

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. LARANJEIRA, L. P. M., FALCAO, D. A., MARTINS, D. A. P., FARIAS, I.C.C, MEDEIROS, R. L. B., HATZLHOFFER, B.L.D, ARAUJO, A. S., LUCENA-ARAUJO, A. R., BEZERRA, M. A. C.

INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DO TGF NA OCORRÊNCIA DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Úlcera de membros inferiores, Laboratorial, Perfil molecular

Áreas do conhecimento: Genética, Genética Humana e Médica

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://hemo.org.br/wp-content/uploads/2015/11/suplemento-2015.pdf>; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular

2. PRADO, L. P. L., MARTINS, D. A. P., FALCAO, D. A., FARIAS, I. C. C, DOMINGOS, I. F., MEDEIROS, R. L. B., ARAUJO, A. S., LUCENA-ARAUJO, A. R., BEZERRA, M. A. C.

PERFIL LABORATORIAL E MOLECULAR DOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME QUE DESENVOLVERAM ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES, DO ESTADO DE PERNAMBUCO, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Polimorfismo, Úlcera Maleolar, TGF-beta

Áreas do conhecimento: Genética Humana e Médica

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: <http://hemo.org.br/wp-content/uploads/2015/11/suplemento-2015.pdf>; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular

3. LARANJEIRA, L. P. M., BEZERRA, M. A. C.

Investigação da associação de polimorfismos no gene TNF-alfa com o desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes portadores de anemia falciforme, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Anemia Falciforme, Manifestações clínicas, Polimorfismo, Úlcera de membros inferiores

Áreas do conhecimento: Genética Humana e Médica

Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Centro de Ciências Sociais-UFPE; Cidade: Recife; Evento: XXI Congresso de Iniciação Científica e V Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da Universidade Federal de Pernambuco; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2015. (Congresso)

INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA DO TGF NA OCORRÊNCIA DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

2. **I Jornada Pernambucana De Hematologia e Hemoterapia**, 2014. (Encontro)

Organização de evento

1. BEZERRA, M. A. C., LARANJEIRA, L. P. M., MARTINS, D. A. P., FALCAO, D. A.

III Curso de Extensão em Hematologia Laboratorial, 2013. (Outro, Organização de evento)

Palavras-chave: Hematologia laboratorial

Referências adicionais: Brasil/Português.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **PRADO, L. P. L.**, DOMINGOS, I. F., FALCAO, D. A.

Participação em banca de Mariana Barros Souto de Souza. **Investigação da talassemia -alfa e do polimorfismo no gene da anexina A2 no desenvolvimento de osteonecrose em pacientes com anemia falciforme**, 2014

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais: Brasil/Português.

2. MARTINS, D. A. P., DOMINGOS, I. F., **PRADO, L. P. L.**, GUEDES, G. M. R.

Participação em banca de Manuela Andrade Costa. **Investigação dos polimorfismos no gene TGFBR3 (rs2038931,rs7526590) na susceptibilidade à ocorrência do priapismo em pacientes com anemia falciforme**, 2014

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Áreas do conhecimento: Genética Humana e Médica

Referências adicionais: Brasil/Português.

APÊNDICE A — TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO MAIORES DE 18 ANOS (resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise dos polimorfismos nos genes *Klotho*, *TNF- α* , *TGF β* e *BMP6* com o desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes portadores de anemia falciforme”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Luana Priscilla Moraes Laranjeira (endereço: Rua Durvália n°83, Jardim Atlântico, Olinda–PE / (81)88914505 / lua_laranjeira@yahoo.com.br) e está sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (macbezerra@bol.com.br / (81) 9800-8105). Também participam também desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo (aderson@hotlink.com.br / (81) 9976-5136) e Betânia Lucena Domingues Hatzhofer (betanialucena@yahoo.com.br / (81) 8824-3127).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr.(a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência e provoca dores, o que pode estar interferir nas suas atividades do dia a dia e gostaríamos que você doasse 1 tubo de sangue, obtido por punção venosa usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, não havendo qualquer outro risco em participar da pesquisa.

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

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

(assinatura do pesquisador)

Análise dos polimorfismos nos genes *Klotho*, *TNF- α* , *TGF β* e *BMP6* com o desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes portadores de anemia falciforme

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Análise dos polimorfismos nos genes *Klotho*, *TNF- α* , *TGF β* e *BMP6* com o desenvolvimento de úlceras maleolares em pacientes portadores de anemia falciforme, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade

Local e data

Assinatura do participante (ou responsável legal)

Impressão
Digital

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: