

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

JÉSSICA VITÓRIA GADELHA DE FREITAS BATISTA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMOS E DA EXPRESSÃO DO GENE
KLOTHO NAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

Recife
2017

JÉSSICA VITÓRIA GADELHA DE FREITAS BATISTA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMOS E DA EXPRESSÃO DO GENE
KLOTHO NAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, área de concentração 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

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Recife

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Batista, Jéssica Vitória Gadelha de Freitas

Avaliação do impacto de polimorfismos e da expressão do gene *KLOTHO* nas complicações clínicas da anemia falciforme / Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista.
– Recife: O Autor, 2017.

91 f.: il., fig, tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

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

Inclui referências e anexos

- 1.** Anemia falciforme 2. Polimorfismo (genética) 3. Expressão gênica I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orient.) II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (coorient.) III. Título

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-317

JESSICA VITORIA GADELHA DE FREITAS BATISTA

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE POLIMORFISMOS E DA EXPRESSÃO DO GENE
KLOTHO NAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

Aprovado em 14/02/2017

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Taciana Furtado de Mendonça Belmont
Universidade de Pernambuco

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

Recife

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que tive e tenho;

À minha família que me possibilitou a oportunidade de ter acesso à educação;

Aos professores que me acompanharam por toda a vida até o momento de hoje;

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pelos ensinamentos passados;

Ao HEMOPE pela imprescindível parceria no desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro;

Aos professores que me apoiaram e orientaram: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra e Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo;

A todos os colegas de laboratório por todos os ensinamentos compartilhados;

A todos do meu convívio pessoal que sempre me apoiaram e estiveram comigo nos mais diversos momentos da minha vida.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença marcada por grande heterogeneidade clínica. Diante disso, muitos genes são investigados a fim de avaliar sua possível modulação no curso clínico da doença: dentre eles, o *KLOTHO* (*KL*), que está envolvido na biologia do óxido nítrico, estresse oxidativo e adesão vascular. Com o objetivo de avaliar o papel de polimorfismos em *KL* na clínica dos indivíduos com AF, investigamos os *SNPs* rs211239 (A>G) e rs685417 (G>A) e sua possível associação com algumas complicações clínicas da doença. Também investigamos os níveis de expressão de *KL*, para avaliar possíveis diferenças entre os genótipos dos *SNPs* estudados e entre as complicações clínicas analisadas. O estudo foi conduzido por comparação de grupos (casos e controles). Após análise de 703 pacientes, não foram encontradas associações do *SNP* rs211239 com nenhuma das complicações. Em contrapartida, os portadores dos genótipos GA e AA para o *SNP* rs685417 apresentaram maior frequência de crises vaso-oclusivas ($p=0,006$), de doença cerebrovascular (DCV) ($p=0,017$), maior número de complicações ($p=0,029$) e menor tempo para desenvolvimento de DCV ($p=0,004$) quando comparados aos indivíduos com genótipo selvagem (GG). No que concerne aos níveis de expressão, não foram encontradas diferenças entre os diferentes genótipos dos polimorfismos nem com as complicações. Por outro lado, houve diferença entre indivíduos com AF (HbSS) e sem AF (HbAA) ($p=0,0001$). Dessa forma, pôde-se perceber que os genótipos GA e AA do *SNP* rs685417 parecem indicar um pior prognóstico ao paciente, embora não tenham se mostrado como fator que altera os níveis de expressão.

Palavras-chave: rs211239. rs685417. Expressão gênica. Heterogeneidade fenotípica. Associação.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a disease characterized by high clinical heterogeneity. Therefore, many genes are investigated in order to evaluate their possible modulation in the clinical course of the disease: among them, *KLOTHO* (*KL*), which is involved in the biology of nitric oxide, oxidative stress and vascular adhesion. In order to evaluate the role of *KL* polymorphisms in the clinical setting of individuals with SCA, we investigated the SNPs rs211239 (A>G) and rs685417 (G>A) and their possible association with some clinical complications of the disease. We also investigated *KL* expression levels to evaluate possible differences between the genotypes of the studied SNPs and between the clinical complications analyzed. The study was conducted by performing a comparison of groups (cases and controls). The analysis of 703 patients showed no associations of the SNP rs211239 with any of the complications. On the other hand, patients with GA and AA genotypes for the rs685417 SNP had a higher frequency of vaso occlusive crises ($p = 0.006$), cerebrovascular disease (CVD) ($p = 0.017$), a greater number of complications ($p = 0.029$), and a shorter time to develop CVD ($p = 0.004$) when compared to individuals with wild genotype (GG). Regarding the levels of expression, no differences were found neither between the different genotypes of the polymorphisms nor with the complications. On the other hand, a notable difference was seen between subjects with SCA (HbSS) and without SCA (HbAA) ($p = 0.0001$). Thus, the genotypes GA and AA of the SNP rs685417 seem to indicate a worse prognosis for the patient, although they have not yet been shown as factors that change levels of expression.

Keywords: rs211239. rs685417. Gene expression. Phenotypic heterogeneity. Association.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – FREQUÊNCIA DA HEMOGLOBINA S NAS DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL (CANÇADO E JESUS, 2007).	17
FIGURA 2 – FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. A FORMA ALTERADA E RÍGIDA DO ERITRÓCITO DEVIDO À POLIMERIZAÇÃO DA HBS INDUZ O PROCESSO DE VASO-OCCLUSÃO E HEMÓLISE. (1) ERITRÓCITOS FALCIZADOS LEVAM À HEMÓLISE INTRAVASCULAR, A QUAL LIBERA HEMOGLOBINA LIVRE (CONSEQUENTEMENTE, HEME) E ARGINASE NO PLASMA. (2) O GRUPAMENTO HEME ATIVA NEUTRÓFILOS E CÉLULAS ENDOTELIAIS QUE INDUZEM A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO. (3) A HB LIVRE E A ARGINASE DIMINUEM A BIODISPONIBILIDADE DE NO PROVOCANDO VASOCONSTRICÇÃO; E CÉLULAS ENDOTELIAIS ATIVAM A COAGULAÇÃO LEVANDO À ADESÃO DE PLAQUETAS AO ENDOTÉLIO COM PARTICIPAÇÃO DE ERITRÓCITOS E NEUTRÓFILOS. (4) DEPENDENDO DA EXTENSÃO DA VASO-OCCLUSÃO, OS TECIDOS PODEM APRESENTAR HIPÓXIA E NECROSE. (MODIFICADO DE DUTRA E BOZZA 2014).	19
FIGURA 3 – PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS β^S NA ÁFRICA E SUA HERANÇA NO BRASIL (LINDENAU 2009).	25
FIGURA 4 – EXEMPLOS DE GENES QUE MOSTRARAM SNPs ASSOCIADOS COM COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME (ADAPTADO DE STEINBERG 2008).	27
FIGURA 5 – ESQUEMA MOSTRANDO O GENE <i>KLOTHO</i> COM OS ÉXONS REPRESENTADOS EM VERDE E OS INTRONS, EM AZUL. ABAIXO DO GENE, É POSSÍVEL VER OS SEUS PRODUTOS: A PROTEÍNA TRANSMEMBRANA E OS RESULTADOS DE SUA CLIVAGEM POR SECRETASES, TAL COMO A PROTEÍNA SECRETADA RESULTANTE DO PROCESSAMENTO ALTERNATIVO DO mRNA (ADAPTADO DE XU E SUN 2015).	29
FIGURA 6 – SOBREVIDA GLOBAL DOS INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NO ESTUDO DE ACORDO COM O MODELO DE ASSOCIAÇÃO DOMINANTE DO POLIMORFISMO rs685417 (G>A).	50
FIGURA 7 – PROBABILIDADE DE OCORRÊNCIA DE DCV EMPREGANDO O MODELO DOMINANTE DE ANÁLISE GENÉTICA PARA O POLIMORFISMO rs685417 (G>A).	51
FIGURA 8 – EXPRESSÃO DIFERENCIADA ENTRE INDIVÍDUOS COM PADRÃO DE HEMOGLOBINA NORMAL (HBAA) E COM ANEMIA FALCIFORME (HBSS).	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EXEMPLOS DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS QUE INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME PODEM APRESENTAR DURANTE SUA VIDA (ADAPTADO DE BALLAS ET AL. 2010).	20
TABELA 2 – <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO QUE COMPREENDE O POLIMORFISMO <i>KL</i> rs211239 (A>G), MOSTRANDO O TAMANHO DA REGIÃO AMPLIFICADA, TAL COMO A ENZIMA DE RESTRIÇÃO UTILIZADA PARA AS ANÁLISES DE TAMANHO DE FRAGMENTO.	39
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO <i>KL</i> rs211239 (A>G).	39
TABELA 4 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO UTILIZADA PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO POLIMORFISMO <i>KL</i> rs211239 (A>G).	40
TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DOS INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME INCLUÍDOS NO ESTUDO.	43
TABELA 6 – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME INCLUÍDOS NO ESTUDO.	44
TABELA 7 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS.	45
TABELA 8 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS GENOTIPADOS PARA OS DIFERENTES POLIMORFISMOS	46
TABELA 9 – MODELO DOMINANTE DE HERANÇA GENÉTICA DO POLIMORFISMO rs685417 (G>A).	48
TABELA 10 – NÚMERO DE INDIVÍDUOS INCLUÍDOS NOS ENSAIOS DE EXPRESSÃO DOS DIFERENTES GRUPOS.	52
TABELA SUPLEMENTAR 1 – MODELO CODOMINANTE DE HERANÇA GENÉTICA DO POLIMORFISMO rs211239 (A>G).	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
$\alpha^{3.7Kb}$	Deleção $\alpha^{3.7kb}$
β^s	Cadeia globínica beta com alteração para a formação da HbS
~	Aproximadamente
A	Adenina
Aa	Aminoácido
ADAM-10	Do inglês, <i>disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
ADAM-17	Do inglês, <i>disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17</i>
AF	Anemia falciforme
AS	<i>Antisense</i>
AST	Aspartato transaminase
AVC	Acidente vascular cerebral
BACE-1	Beta-secretase 1
BAN	Bantu
BEN	Benin
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
C	Citosina
CAM	Camarões

CAR	República Centro-Africana
CD47	Cluster de diferenciação 47
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa
cGMP	Do inglês, <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CSSCD	Do inglês, <i>cooperative study of sickle cell disease</i>
CVO	Crise vaso-oclusiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTC	<i>Doppler</i> transcraniano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FGF-23	Do inglês, <i>fibroblast growth factor 23</i>
FOXO	Do inglês, <i>mammalian forkhead box O</i>
G	Guanina
Glu	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
HbAS	Indivíduo traço falciforme
<i>HBB</i>	Gene da subunidade beta da hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
<i>HBG 2</i>	Gene da hemoglobina subunidade gama 2
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Indivíduo homozigoto para a mutação β^s
HCl	Ácido clorídrico

HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hemope	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	Do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Do inglês, <i>intercelular adhesion molecule 1</i>
IGF-1	Do inglês, <i>insulin growth factor 1</i>
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de potássio
KL	<i>Klotho</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LEMTE	Laboratório de estudos moleculares e estudo experimental
MAF	Do inglês, <i>minor allele frequency</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
MnSOD	Do inglês, <i>mitochondrial antioxidant manganese superoxide dismutase</i>
NaCl ₂	Cloreto de sódio
NCBI	Do inglês, <i>national center for biotechnology information</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
NO	Do inglês, <i>nitric oxide</i>
O ₂	Oxigênio
OD	<i>Odds ratio</i>
Pb	Pares de base
PBS	Do inglês, <i>phospate buffered saline</i>
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Pernambuco

pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Fosfatidilserina
RBC	Do inglês, <i>red blood cells</i>
RFLP	Do inglês, <u>Restriction Fragment Length Polymorphism</u>
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Do inglês, <i>Real time - quantitative polymerase chain reaction</i>
S	<i>Sense</i>
SAL	Saudi-Árabe ou Árabe-índiano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEM	Senegal
SNP	Do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
STOP	Do inglês, <i>Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia</i>
T	Timina
TaqPol	Taq Polimerase
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Do inglês, <i>tumor necrosis factor α</i>
TRPV5	Do inglês, <i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 5</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Val	Valina
VCAM-1	Do inglês, <i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VCM	Volume corpuscular médio
WBC	Do inglês, <i>white blood cells</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. ANEMIA FALCIFORME	16
2.1.1. Etiologia e epidemiologia.....	16
2.1.2. Fisiopatologia	17
2.1.3. Complicações clínicas	19
2.1.4. Modulação genética da Anemia Falciforme.....	23
2.2 <i>KLOTHO</i>	27
2.2.1. Gene e proteínas.....	28
2.2.2. Funções.....	29
2.2.3. Estudos na AF	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. DESENHO DO ESTUDO	34
4.2. DEFINIÇÃO DE GRUPOS	34
4.3. ANÁLISE LABORATORIAL	36
4.4. ANÁLISES MOLECULARES	36
4.4.1. Extração do DNA genômico	37
4.4.2. Extração do RNA a partir dos leucócitos totais e síntese do DNA complementar (cDNA)	40
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4.6. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COM AF	43
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS QUANTO AOS MODULADORES CLÁSSICOS DA ANEMIA FALCIFORME	45
5.3. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>KLOTHO</i>	45
5.3.1. Associação dos SNPs estudados com a ocorrência das principais complicações na AF	46
5.4. ENSAIOS DE EXPRESSÃO DE <i>KL</i>	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	67
ANEXO A: PROJETO APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	70
APÊNDICE A: ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	71
CURRICULUM VITAE (LATTES)	84

1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a doença monogênica mais comum no mundo, sendo caracterizada pela herança da hemoglobina S (Hb S), decorrente de uma mutação no gene que codifica a cadeia globínica β (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val), em homozigose. A fisiopatologia dessa doença é multifacetada, havendo anormalidades estruturais e funcionais.

A HbS é instável, de modo que, sob baixas concentrações de oxigênio, polimeriza e precipita-se, levando a deformações na morfologia eritrocitária, na sua membrana e em sua deformabilidade. Os eritrócitos contendo HbS possuem menor sobrevida na circulação e são mais aderentes ao endotélio, fatos estes que, unidos ao processo inflamatório crônico característico da doença, contribuem para os fenômenos vaso-oclusivos e hemolíticos, culminando em alteração da homeostase vascular. Juntos, estes eventos levam às principais complicações clínicas da AF: intensas crises de dor, síndrome torácica aguda (STA), priapismo, acidente vascular cerebral (AVC), úlceras de membros inferiores (UMI) e osteonecrose.

Apesar de ser uma condição monogênica, os indivíduos apresentam grande heterogeneidade fenotípica entre si: enquanto alguns cursam com quadro clínico brando, outros necessitam de constantes internamentos para tratar as complicações. Essa variabilidade está, em parte, associada a fatores ambientais e à condição socio-econômica, que impacta o acesso aos serviços de atenção à saúde básica e, somado a isso, diversos moduladores moleculares têm sido associados com a estratificação prognóstica dos indivíduos com AF.

Dois moduladores genéticos já são bem estabelecidos quanto à associação com a gravidade da doença: os haplótipos β^S e a co-herança com a talassemia α . Contudo, eles não são suficientes para elucidar a variabilidade clínica apresentada, conduzindo à busca de outros moduladores que possam auxiliar como indicativos do curso clínico dos indivíduos com AF.

Nesse contexto, encontra-se a importância do gene *KLOTHO* (*KL*). Descoberto em 1997 por Kuro-o e colaboradores, foi inicialmente relacionado ao envelhecimento precoce em camundongos mutados, os quais, além de terem menor tempo de vida quando comparados aos selvagens, apresentaram diversas complicações fisiológicas, como atrofia de órgãos, arteriosclerose e osteoporose.

O gene *KL* codifica uma proteína transmembrana que atua como co-receptor de FGF-23 e uma fração solúvel que atua de modo humoral. A proteína *KL* atua em diversos mecanismos que são importantes na fisiopatologia da AF, como a supressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, produção de óxido nítrico (NO) e supressão do estresse oxidativo.

Por esse importante papel na homeostase vascular, alguns estudos buscaram associações entre polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) no *KL* e as complicações clínicas da AF. Alguns autores, avaliando diferentes grupos populacionais, encontraram associações destas variantes com a maior frequência de complicações clínicas nos indivíduos avaliados.

Dessa forma, objetivamos estudar variantes genéticas no gene *KL*, bem como avaliar seu perfil de expressão, buscando possíveis associações com uma maior frequência das principais complicações clínicas que acometem os indivíduos com AF. Tais experimentos podem contribuir para elucidar o papel de *KL* no curso clínico desses indivíduos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANEMIA FALCIFORME

2.1.1. Etiologia e epidemiologia

As hemoglobinopatias são os distúrbios genéticos mais comuns e difundidos no mundo (Simões et al. 2010), podendo ser causadas pela herança genética de hemoglobinas variantes (como as hemoglobinas S e C, por exemplo) ou pela síntese insuficiente de cadeias globínicas, como as talassemias (Howard e Davies 2007).

Dentre elas, destaca-se a hemoglobina variante S (HbS), que é a desordem hereditária mais comum conhecida nos seres humanos, sendo originada por uma mutação pontual que ocorre no sexto códon do gene que codifica a cadeia globínica β (*HBB*), de localização cromossômica 11p15.5 (Ingram 1959; Sommer et al. 2006). Tal mutação, que é a substituição de adenina por timina, leva à troca do ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica β (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val). Desse modo, a HbS (formada pelas cadeias globínicas $\alpha_2\beta^S_2$), que é instável, substitui a hemoglobina normal A (HbA) ($\alpha_2\beta_2$), que é a mais comum no indivíduo humano adulto não portador de hemoglobinopatia (Driss et al. 2009).

Estudos sugerem que essa mutação teve origem na África e Ásia (Nagel e Labie, 1989), sendo introduzida ao Brasil pelo tráfico de escravos oriundos de tribos africanas no período colonial escravagista. Como a presença do negro africano contribuiu para a formação étnica da população brasileira, a hemoglobinopatia S é a mais frequente no país: estima-se que 5-6% da população seja portadora do alelo β^S (Lyra et al. 2005).

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

Em 2001, o Ministério da Saúde, mediante a portaria nº822/01, determinou que a pesquisa de hemoglobinopatias fosse realizada como parte do Programa de Triagem Neonatal. Dessa forma, o levantamento epidemiológico de nascidos vivos com HbS nas regiões brasileiras é facilitado. Na figura 1, é possível observar que estados que utilizaram mais intensamente a mão de obra escrava, como Pernambuco, apresentam maior número de indivíduos portadores dessa hemoglobina (Cançado e Jesus 2007; Wagner et al. 2010).

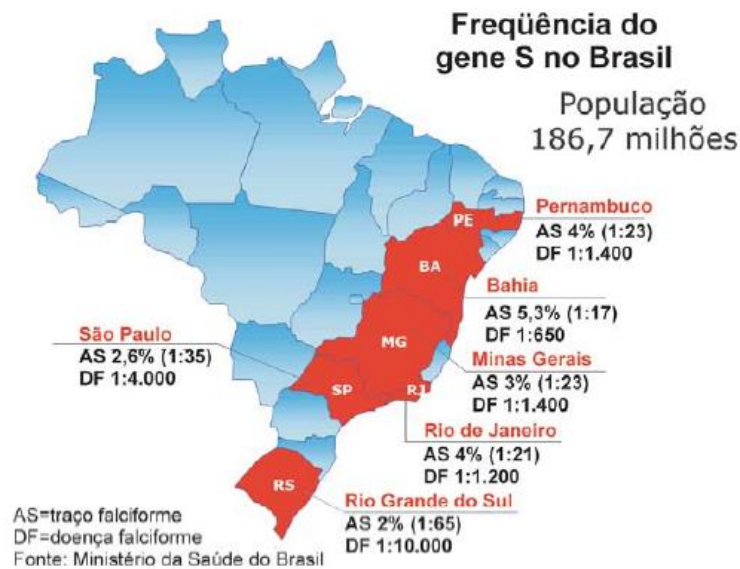


Figura 1: Frequência da Hemoglobina S nas diferentes regiões do Brasil (Cançado e Jesus, 2007).

2.1.2. Fisiopatologia

A anormalidade estrutural da HbS é o ponto chave que leva às complicações clínicas nos indivíduos com doenças falciformes. Sob condições de baixas concentrações de oxigênio, as moléculas de HbS presentes no interior dos eritrócitos polimerizam, precipitando e conduzindo a modificações na morfologia e membrana celulares. Com essa precipitação, a célula pode assumir variadas conformações, sendo a mais comum a “hemácia em foice” ou “hemácia falcizada”, característica esta que leva ao nome da doença (Zago e Pinto 2007).

A cinética dessa polimerização da HbS possui relação exponencial com sua concentração intra-eritrocitária, demonstrando assim o importante papel da concentração dessa hemoglobina no processo de falcização. Dessa forma, tem-se a justificativa do motivo que leva a AF a ser a condição mais grave dentre as doenças

falciformes, pois é a que apresenta maiores concentrações intraeritrocitárias de HbS (Franceschi et al. 2011).

Essas modificações celulares, então, levam a fenômenos vaso-oclusivos e intensa hemólise. Intrínseco a esses fatores, há um quadro de inflamação crônica nos indivíduos (Conran et al. 2009; Rees et al. 2010; Singhal et al. 2016).

Os fenômenos vaso-oclusivos contam com a participação dos diversos componentes sanguíneos: eritrócitos, reticulócitos, leucócitos, plaquetas e também o endotélio vascular. Os eritrócitos falciformes apresentam maior concentração de moléculas de adesão em sua superfície, favorecendo o processo de interação com o endotélio e com outros componentes da circulação, como leucócitos e plaquetas. Uma das moléculas de adesão exposta em grande quantidade pelo eritrócito falcizado é a fosfatidilserina (PS), a qual o deixa até três vezes mais aderente quando comparado aos eritrócitos normais (Zago e Pinto 2007). Além dessa maior aderência, a exposição da PS foi correlacionada com a geração de trombina, substância relacionada à formação de coágulos de fibrina, que também contribuem para a oclusão vascular (Hebbel 1997). No fenômeno vaso-oclusivo há, ainda, participação de leucócitos, os quais têm atração facilitada pela trombospondina, ligando-se à proteína de adesão CD47 expressa nos eritrócitos falciformes. A vaso-oclusão, então, gera uma cascata que se retroalimenta: gera hipóxia, que gera inflamação, atraindo, assim, mais leucócitos e ativando continuamente o endotélio (que expressam mais moléculas de adesão, como VCAM-1 e ICAM-1, facilitando a adesão dos elementos sanguíneos) (Zago e Pinto 2007).

Além da vaso-oclusão, os indivíduos falciformes apresentam intensa hemólise: os eritrócitos permanecem na circulação de dois a vinte e um dias, fato este que se reflete nas baixas concentrações de hemoglobina (Hb), aumento do número de reticulócitos circulantes e aumento da concentração de marcadores de hemólise, como lactato desidrogenase (LDH) e bilirrubinas (De Ceulaer et al. 1983; Ballas e Marcolina 2006). Essa hemólise crônica tem importante papel na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), o qual está envolvido nos processos de vasodilatação, inibição da ativação e agregação plaquetária e também na diminuição da expressão de moléculas de adesão (Reiter et al. 2002; Armenis et al. 2017).

O processo hemolítico pode ocorrer extra ou intravascularmente. Quando dentro dos vasos, libera hemoglobina livre e arginase. Aquela consome o NO formando metehemoglobina e gerando espécies oxidantes que também consomem

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

Dessa forma, pode-se perceber que, a nível molecular, todo o processo vaso-oclusivo, hemolítico e inflamatório está relacionado (Figura 2), sendo eles os responsáveis pelas complicações clínicas apresentadas pelos indivíduos portadores de AF (Zago e Pinto 2007).

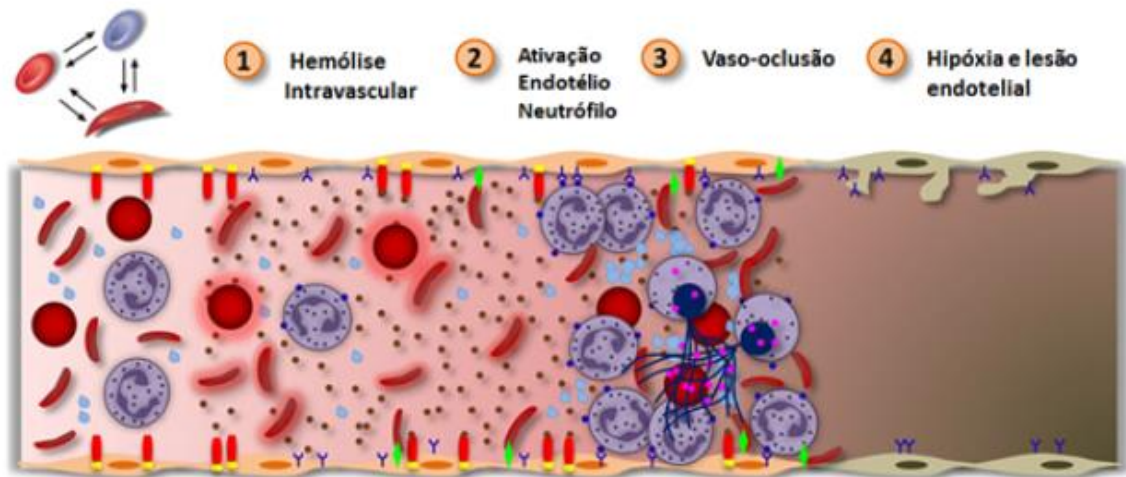


Figura 2: Fisiopatologia da anemia falciforme. A forma alterada e rígida do eritrócito devido à polimerização da HbS induz o processo de vaso-oclusão e hemólise. (1) Eritrócitos falcizados levam à hemólise intravascular, a qual libera hemoglobina livre (consequentemente, heme) e arginase no plasma. (2)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

2.1.3. Complicações clínicas

O estado inflamatório crônico aliado aos fenômenos vaso-oclusivos e à intensa hemólise leva os indivíduos com anemia falciforme a apresentarem diversas complicações clínicas, que acometem diversos órgãos e tecidos, podendo ser mais ou menos incapacitantes, agudas ou crônicas (Steinberg 2008a; Ballas et al. 2010). Na tabela 1, estão resumidas algumas das complicações que podem ser apresentadas.

Tabela 1: Exemplos de complicações clínicas que indivíduos com anemia falciforme podem apresentar durante sua vida (Adaptado de Ballas et al. 2010).

Episódios de dor
Infecções recorrentes
Exacerbações agudas da anemia
Sequestro esplênico
Crise aplástica
Complicações cardíacas
Cardiomegalia
Hipertensão arterial sistêmica
Insuficiência cardíaca congestiva
Complicações gastrointestinais e hepato-biliares
Colelitíase
Complicações musculares, esqueléticas e dermatológicas
Osteonecrose
Úlceras de perna
Complicações neurológicas
Acidente vascular cerebral
Complicações oftalmológicas
Complicações pulmonares
Complicações renais
Complicações genito-urinárias
Priapismo
Complicações esplênicas
Sequestro esplênico
Autoesplenectomia

Dentre todas as complicações, a mais comum apresentada pelos indivíduos é a vaso-oclusão, a qual leva à isquemia tecidual, causando danos vasculares e inflamação que se refletem em episódios agudos de intensa dor, sendo a principal causa de admissão hospitalar dos pacientes com AF (Lovett et al. 2014). Os eventos vaso-oclusivos podem ocorrer em qualquer órgão, sendo mais comuns na medula óssea, logo é tida como um evento predominantemente ósseo (Almeida e Roberts 2005). As primeiras crises geralmente manifestam-se com dor nos pés e mãos, evento este chamado dactilite. Em crianças com idade escolar, a dor é principalmente nos ossos longos e, quando mais velhos, costumam ter crises dolorosas na coluna (Howard e Davies 2007).

A síndrome torácica aguda (STA) é tida como a segunda maior causa de admissões hospitalares em indivíduos com AF, acometendo aproximadamente 50% deles (Vichinsky et al. 1997; Vichinsky et al. 2000). Caracterizada por febre, dor no peito, infiltrado pulmonar e dificuldade respiratória, é a principal causa de morte dos adultos jovens com AF (Quinn 2013).

Outro evento agudo que acomete os indivíduos é o acidente vascular cerebral (AVC), que é cerca de 300 vezes mais frequente em indivíduos com anemia falciforme do que naqueles sem a hemoglobinopatia, ocorrendo em aproximadamente 11% dos indivíduos até os 20 anos de idade (Balkaram et al. 1992; Earley et al. 1998). Nas crianças, é mais comum a ocorrência do AVC do tipo isquêmico, que é causado por estenose e vaso-oclusão. Nos adultos, por sua vez, é mais comum a ocorrência do AVC hemorrágico, geralmente causado pela ruptura de aneurismas devido ao dano vascular acumulado durante os anos (Switzer et al. 2006). Na década de 1990, Adams e colaboradores publicaram o estudo *STOP (Stroke prevention trial for sickle cell anemia)*, no qual foi relatado que crianças com risco aumentado de ocorrência de AVC (determinado pelo método não invasivo de *doppler* transcraniano (DTC)), quando submetidas a regime de transfusão crônica, apresentam menores chances de desenvolvimento da complicação (Adams et al. 1998). Até hoje, o DTC, seguido de regime de hipertransfusão nos indivíduos com velocidades alteradas, é o protocolo de prevenção, porém o exame só pode ser realizado em indivíduos com idade inferior a 16 anos, devido ao espessamento da calota craniana (Domingos et al. 2014).

Danos renais e cardíacos também são comuns nos indivíduos com AF. Nos rins, a baixa tensão de O₂, baixo pH e alta osmolaridade favorecem a polimerização da HbS e consequente vaso-oclusão, levando os indivíduos a, desde cedo, apresentarem infarto renal (Rees et al. 2010). Cerca de 30% dos adultos desenvolvem insuficiência renal crônica, sendo causa de morte em diversos casos (Platt et al. 1994). No que concerne ao sistema cardiovascular, os indivíduos com AF apresentam diversas complicações que aumentam a morbimortalidade da doença (Vasconcelos et al. 2015). Dentre as alterações cardíacas estão cardiomegalia, valvulopatias e insuficiência cardíaca congestiva (Ballas et al. 2010). Tais alterações ocorrem tanto em decorrência ao alto débito cardíaco, que leva ao aumento das câmaras cardíacas desde a infância, como também pela vaso-oclusão, uma vez que os eventos isquêmicos promovem lesões cardíacas como a fibrose (Gualandro et al. 2007).

O tecido ósseo, por apresentar microvasculatura que favorece a falcização dos eritrócitos, é bastante afetado nos indivíduos com AF. Além da já citada vaso-oclusão, os indivíduos podem apresentar danos teciduais e chegar a desenvolver a condição crônica da osteonecrose (Bennett e Namnyak 1990). Essa complicação, também chamada necrose isquêmica, atinge cerca de 50% dos indivíduos AF após os 30 anos de idade, causando intensas dores e, quando na junção osteoarticular do

quadril, dificuldade de locomoção, diminuindo a qualidade de vida (Bezerra et al. 2012). O único tratamento disponível é a artroplastia, que consiste na colocação de uma prótese na cabeça do fêmur do paciente. Tal procedimento, entretanto, apresenta altos índices de morbimortalidade e, em 50% dos casos, requer nova cirurgia após 5 ou 10 anos (Al-Mousawi et al. 2002). Para o diagnóstico, a melhor técnica é a ressonância magnética, a qual detecta lesões no estágio inicial da complicação, fato importante para que o indivíduo possa tomar medidas que, embora não impeçam a progressão da lesão, podem retardá-la, como perda de peso, hidratação adequada e abstenção de algumas atividades físicas (Almeida e Roberts 2005).

Outra complicação comum é o desenvolvimento de úlceras em membros inferiores (UMI), que é a manifestação cutânea mais comum nesses indivíduos e incide de 25% a 75% deles, sendo mais comum nas regiões tropicais e subtropicais devido ao clima e às baixas condições socioeconômicas (Cumming et al. 2008; Alavi e Kirsner 2015). Podendo surgir espontaneamente ou em decorrência de pequenos traumas, as úlceras dos indivíduos com AF são muito dolorosas, têm cicatrização mais lenta do que aquelas de outras etiologias, pouca resposta aos tratamentos e alta reincidência, além de serem susceptíveis à infecção por microorganismos, agravando o caso, contribuindo para diminuição na qualidade de vida do indivíduo afetado (Powars et al. 2005; Paladino 2007). Quanto a sua etiologia, os fenômenos vaso-occlusivos, ao provocarem hipóxia, inflamação e consequente necrose, levam ao dano tecidual contribuindo para a ocorrência dos ferimentos (Paladino 2007). A intensa hemólise, que diminui a biodisponibilidade do NO, também parece ter importante contribuição na abertura das úlceras, uma vez que essa complicação é vista em outras formas de anemia hemolítica e os indivíduos que a apresentam mostram dados laboratoriais com altas concentrações dos marcadores de hemólise, como LDH e bilirrubinas quando comparados aos indivíduos sem a manifestação (Kato et al. 2007). Essas úlceras podem ser classificadas em agudas ou crônicas: aquelas com duração inferior a um mês são ditas agudas e as que passam desse período são classificadas como crônicas (Minniti et al. 2010).

Além dessas complicações, outra que é comum nos indivíduos do sexo masculino é o priapismo, que é definido como uma ereção peniana prolongada e dolorosa que ocorre na ausência de estímulo sexual e acomete menos de uma pessoa a cada 100.000 habitantes na população geral (Eland et al. 2001). Nos indivíduos com AF essa frequência eleva-se para 40% (Steinberg 2008b), dos quais, 90% apresentam

pelo menos um episódio até os 20 anos de idade (Mantadakis et al. 1999). Na AF, 95% dos eventos de priapismo são do tipo isquêmico ou de baixo fluxo, o qual, devido à baixa oxigenação do sangue, está associado à inflamação que, na ausência de tratamento adequado, pode levar à necrose tecidual podendo causar impotência (Vicari e Figueiredo 2007). Embora haja participação de evento vaso-oclusivo na sua ocorrência, o priapismo é tido como uma complicação clínica fortemente associada à intensa hemólise, pois há elevadas concentrações de marcadores hemolíticos (Kato et al. 2007). Além disso, a diminuição na biodisponibilidade de NO promove uma redução da fosfodiesterase-5 que têm seu papel ligado à inativação do cGMP, um importante agente causal de ereção peniana persistente.

Com o exposto, percebe-se, então, que os indivíduos AF podem apresentar diversas complicações clínicas. Porém, o acompanhamento médico mostra que há grande heterogeneidade no modo como a doença se manifesta: enquanto alguns cursam com quadro clínico brando, apresentando poucas complicações, outros cursam com uma clínica adversa (Sebastiani et al. 2010). Essa variabilidade fenotípica pode, em parte, ser explicada por fatores externos, como a condição socio-econômica do indivíduo, que determinará maior ou menor acesso a informações acerca da doença e tratamento adequado, por exemplo (Christakis et al. 1990; Cajado et al. 2011). Esses pontos, entretanto, não explicam totalmente as diferenças encontradas, sendo pesquisados fatores genéticos que possam ser indicativos do prognóstico da AF (Steinberg 2009).

2.1.4. Modulação genética da Anemia Falciforme

Até o momento, dois moduladores genéticos foram bem descritos quanto a sua influência na modulação clínica de indivíduos com anemia falciforme: os haplótipos β^s e a co-herança com a talassemia α (Higgs et al. 1982; Hazmi et al. 1999; Domingos et al. 2014).

a. Haplótipos β^s

O *cluster* da globina β apresenta sítios polimórficos que são herdados em blocos haplotípicos (Sutton et al. 1989). São descritos cinco padrões de sítios polimórficos distintos em regiões específicas do continente africano e asiático, sugerindo que a mutação que gera a HbS provavelmente originou-se em cinco regiões

independentes espalhando-se para outras regiões do globo (Pagnier et al. 1984). Os nomes dados a esses haplótipos são referentes ao seu local de origem: Bantu ou República Centro Africana (BAN ou CAR) corresponde aos indivíduos do centro-sul e leste africano; Benin (BEN) àqueles do meio-oeste africano; Senegal (SEN), África Atlântica; Árabe-Indiano ou Saudi (ARB ou SAU), à Índia e Península Arábida Ocidental; e, por fim, o haplótipo Camarões (CAM), restrito, na África, ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (Antonarakis et al. 1984; Pagnier et al. 1984). Além desses, há padrões haplotípicos que não correspondem a nenhum deles, sendo chamado de haplótipos atípicos (ATP). Tal atipia pode ocorrer por mecanismos genéticos que levem a mutações pontuais nos sítios polimórficos de restrição e, por isso, não se enquadra nos cinco padrões bem estabelecidos (Zago et al. 2000).

A influência desses haplótipos na clínica dos indivíduos com AF dá-se devido a sua influência na produção de HbF ($\alpha_2\gamma_2$), visto que esta não forma polímeros com a HbS, e, assim, quanto maiores os níveis de HbF, melhor tende a ser o curso clínico (Zago e Pinto 2007).

Indivíduos com a transição presente na região -158 (C→T) do gene *HBG 2* tendem a produzir mais HbF devido ao aumento da produção de cadeias γ^G , como é o caso dos haplótipos SAU e SEN, que cursam com concentrações de HbF superiores a 15%. Os indivíduos com haplótipo CAR apresentam menores concentrações de HbF, cursando com clínica mais grave. Em relação ao BEN, há concentrações intermediárias de HbF, sendo difícil a caracterização do curso clínico daqueles que apresentam este haplótipo (Powars 1991).

No Brasil, estudos mostraram que o haplótipo CAR é o mais comum nas regiões Nordeste e Sudeste, exceto na Bahia, onde há elevada prevalência do haplótipo BEN (Adorno et al. 2004; Bezerra et al. 2007). Em Pernambuco, o trabalho de Bezerra et al. (2007), ao caracterizar a composição haplotípica de 74 indivíduos com doença falciforme, encontrou prevalência de 81% para o haplótipo CAR. Tais achados são condizentes com a origem geográfica dos escravos trazidos ao Brasil no período colonial, uma vez que os negros oriundos do golfo do Benin foram, em sua maioria, encaminhados para a Bahia e os oriundos do Congo e Angola, para as demais regiões brasileiras (Figura 3) (Verger 1987).

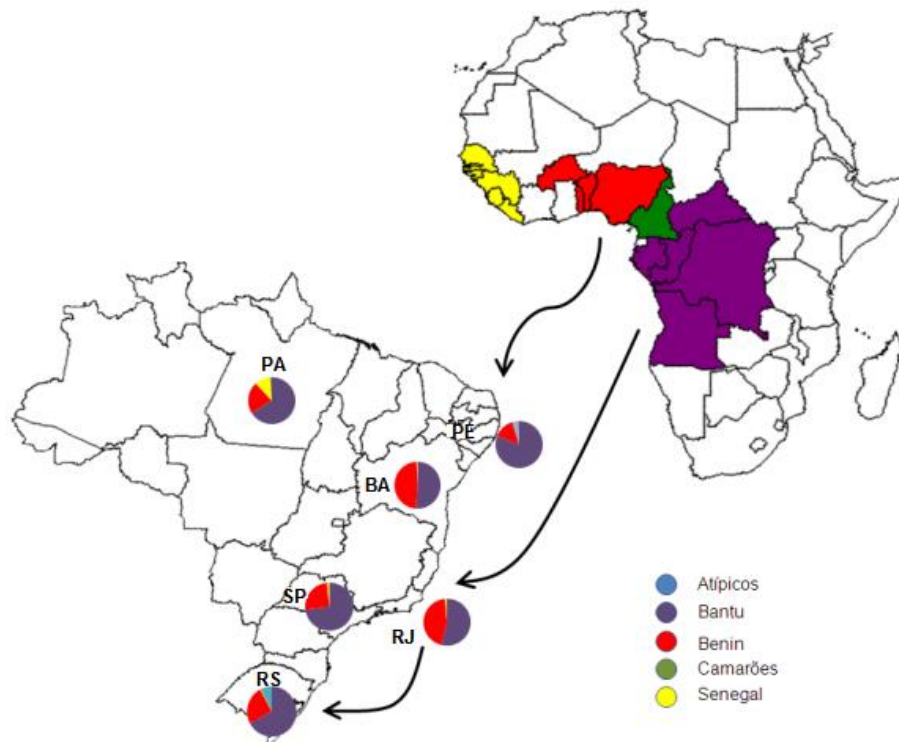


Figura 3: Padrões de distribuição dos haplótipos β^s na África e sua herança no Brasil (Lindenau 2009).

b. Talassemia α

A talassemia α , assim como a anemia falciforme, é uma hemoglobinopatia de alta frequência em indivíduos da África, sendo comum a co-herança das duas mutações (Kan e Dozy 1978; Steinberg e Embury 1986; Steinberg 2009). Nela, diferente da hemoglobinopatia S, ocorre diminuição ou ausência de cadeias α da molécula de hemoglobina, sendo as principais causas as deleções de 3.7 kb e 4.2 kb (Dodé et al. 1992).

A talassemia α diminui as concentrações intracelulares de HbS, levando à menor polimerização e consequente redução da hemólise. Assim, indivíduos que apresentam as duas hemoglobinopatias tendem a apresentar maiores concentrações de hemoglobina e menores níveis dos marcadores hemolíticos. Essa hemólise diminuída faz com que os indivíduos cursem com menos complicações de cunho hemolítico, como AVC, priapismo e úlceras de perna (Kato et al. 2007). Por outro lado, a co-herança eleva a viscosidade sanguínea, favorecendo o surgimento de complicações decorrentes da vaso-oclusão, como a osteonecrose e as crises de dor (Steinberg 2005).

c. Outros moduladores genéticos na anemia falciforme

Embora os haplótipos β^S e a co-herança com talassemia α sejam importantes moduladores da evolução clínica dos indivíduos com anemia falciforme, sozinhos eles não explicam toda a heterogeneidade fenotípica observada (Steinberg e Adewoye 2006). Dessa forma, estudos de associação de polimorfismos genéticos passaram a ser desenvolvidos em busca de resultados que ajudassem a compreender como essa variabilidade é modulada (Steinberg 2008a).

Polimorfismos são variações genéticas que ocorrem com frequência superior a 1% na população (Collins et al. 1998). À época do mapeamento do genoma humano, descobriu-se que há uma vasta quantidade deles, os quais são os principais responsáveis pela variabilidade encontrada entre os indivíduos. Hoje, sabe-se que há mais de 19 milhões de polimorfismos no genoma de nossa espécie. A partir do mapeamento dessas variantes genéticas, diversos estudos passaram a ser desenvolvidos buscando associações de algumas delas com as mais variadas características e doenças a partir da comparação de diferentes genótipos entre grupos casos (que apresentam o fenótipo investigado) e controles (que não apresentam o fenótipo) (Pacheco e Moraes 2009; Fertrin e Costa 2010).

Na AF, polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphisms* – *SNPs*) em genes envolvidos em processos importantes na fisiopatologia da doença (como, por exemplo, na biologia do NO, inflamação, adesão endotelial, estresse oxidativo) passaram a ser estudados (Steinberg 2008b). Na figura 4, é possível observar alguns genes que tiveram *SNPs* associados a complicações nos indivíduos falciformes.

Em sua revisão, Stram (2004) mostrou um modo mais rápido e eficaz para a condução de estudos de associação envolvendo polimorfismos a partir da seleção de polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação com outros próximos a ele, compondo haploblocos. A eles, é dado o nome de *TagSNPs*, os quais representam uma região dentro do gene e, deste modo, o pesquisador pode selecionar alguns *TagSNPs* frequentes na população de estudo e varrer uma considerável região gênica, otimizando tempo e recursos financeiros da pesquisa (Stram 2004).

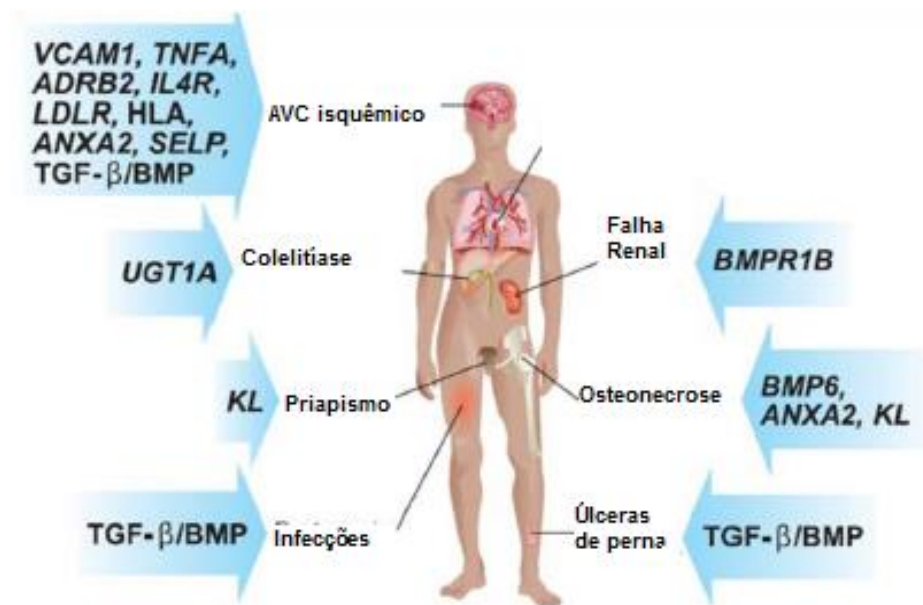


Figura 4: Exemplos de genes que mostraram SNPs associados com complicações clínicas da anemia falciforme (Adaptado de Steinberg 2008).

2.2 KLOTHO

Kuro-o e colaboradores (1997), ao tentarem criar camundongos transgênicos, inseriram, por micro-injeção, um transgene no núcleo desses animais. Esse transgene, entretanto, não foi expresso e percebeu-se que os camundongos com a inserção apresentaram fenótipo de envelhecimento precoce, além de tempo de vida menor quando comparado aos animais selvagens. Perceberam, então, que a inserção havia se dado na região promotora de um gene até então desconhecido, ao qual deram o nome de *Klotho*, em alusão à deusa Clotho, que, na Mitologia Grega, é responsável pelo regimento do curso da vida.

Esses animais, além de apresentarem tempo de vida consideravelmente mais curto do que aqueles que não sofreram mutação (tempo de vida de cerca de 60 dias, enquanto os selvagens viviam mais de 100 dias), também apresentaram fenótipo de envelhecimento precoce: distúrbio de marcha, atrofia de órgãos como o timo, calcificação ectópica, arteriosclerose, atrofia muscular, osteoporose e enfisema (Kuro-o et al. 1997). A partir desse estudo, diversas outras pesquisas foram e são realizadas com esse gene a fim de encontrar contribuições dele em diversos fenótipos.

2.2.1. Gene e proteínas

O *Klotho* (*KL*) é um gene altamente conservado em humanos, ratos e camundongos, tal como as proteínas por ele codificadas (Wang e Sun 2009a). É interessante saber que foram relatados dois genes parálogos a ele, os chamados β -*Klotho* e γ -*Klotho*, sendo, por isso, o *Klotho*, em alguns trabalhos, reportado como α -*Klotho* (neste trabalho, é referido como *Klotho*). Esses parálogos, entretanto, não são tão bem estudados nem suas funções são bem estabelecidas como o *Klotho*, que é o foco deste trabalho (Kuro-o 2012; Kim et al. 2015).

Em humanos, *KL* está localizado no cromossomo 13q12, tem 50 kb e possui cinco éxons e quatro íntrons (Matsumura et al. 1998). Devido à ocorrência de um processamento alternativo no éxon 3, a sua transcrição pode ocorrer de duas maneiras. Nesse éxon, há uma inserção de 50 pares de base (pb) que possui o códon de parada TAG (o G é o primeiro nucleotídeo do éxon 4, enquanto TA estão no éxon 3). Se ocorrer o processamento, esse códon de parada é retirado e é codificada uma proteína de 1012 aminoácidos (3036 pb) que é transmembrana e contém um pequeno domínio não funcional (~10 aa) e dois domínios extracelulares com sequências que se repetem, chamadas KL1 e KL2. Contudo, caso o processamento não ocorra, a proteína gerada será truncada com apenas 549 aminoácidos e secretada, agindo como fator humoral (Matsumura et al. 1998; Kim et al. 2015).

A proteína transmembrana é expressa em menor quantidade do que a forma secretada e é encontrada em diversos tecidos e órgãos, como, por exemplo, no rim, aorta, epitélio, tecidos endócrinos e em células neuronais (Lim et al. 2015).

É importante destacar que, na circulação, não existe apenas a forma secretada originada pelo processamento alternativo. A proteína transmembrana pode passar por modificações pós-traducionais sendo clivada por α e β -secretases (ADAM-10, ADAM-17 e BACE1), gerando porções solúveis de 65 kDa e 130 kDa que permanecem na circulação ainda mais tempo do que o produto truncado, funcionando também como fator humoral, sendo a quebra do tipo α , que gera o produto de 130 kDa, mais comum (Bloch et al. 2010; Xu e Sun 2015). Na figura 5, é mostrado, esquematicamente, o gene *KL*, tal como seus produtos.

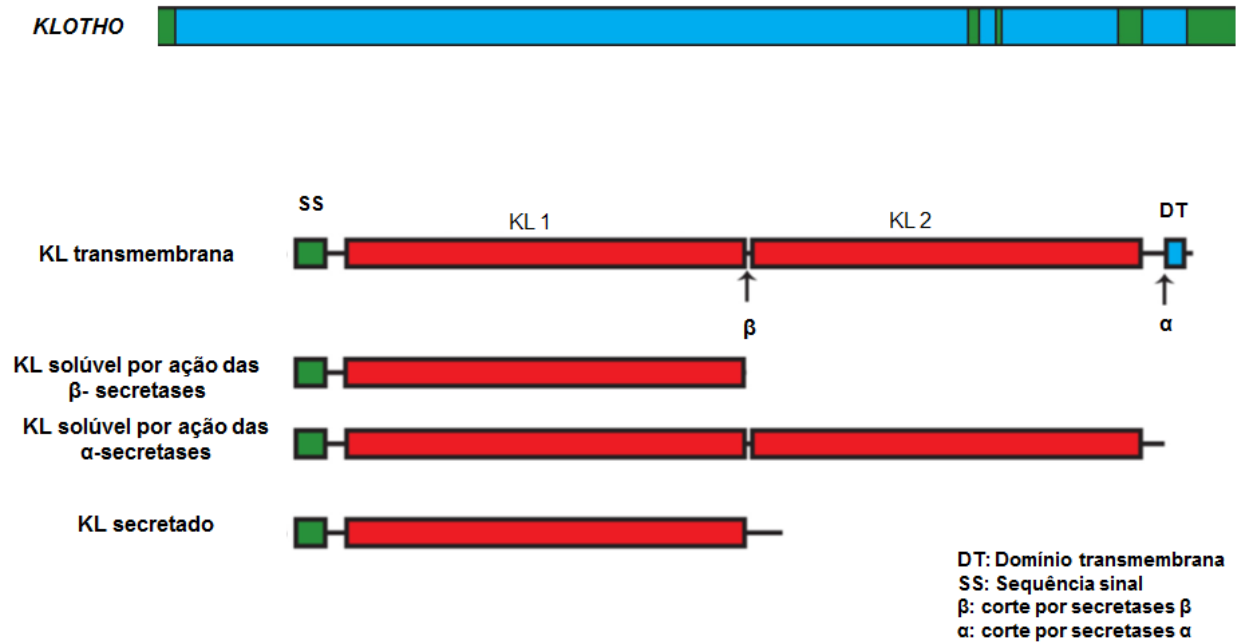


Figura 5: Esquema mostrando o gene *KLOTHO* com os éxons representados em verde e os introns, em azul. Abaixo do gene, é possível ver os seus produtos: a proteína transmembrana e os resultados de sua clivagem por secretases, tal como a proteína secretada resultante do processamento alternativo do mRNA (Adaptado de Xu e Sun 2015).

2.2.2. Funções

Desde a sua descoberta, *KL* vem sendo intensivamente estudado. Em pesquisa realizada em janeiro de 2017 no *NCBI* (PubMed) utilizando a palavra “Klotho”, um total de 1514 resultados foram encontrados.

Diante dessas pesquisas, diversas funções foram atribuídas a seus produtos. A proteína *KL* transmembrana atua como co-receptor do hormônio ósseo fator de crescimento de fibroblastos 23 (do inglês, *fibroblast growth fator 23* – *FGF23*) otimizando sua ligação ao seu receptor, e permitindo, assim, que exerça sua função de manter homeostase de cálcio e biossíntese de vitamina D (Liu e Quarles 2007). O *KL* circulante, por sua vez, atua de modo humoral exercendo sua função nos mais diversos órgãos e tecidos (Wang e Sun 2009b), participando, por exemplo, da supressão da sinalização Wnt, evitando envelhecimento precoce (essa via está relacionada à proliferação celular, logo, se ativada de modo aumentado, pode levar à depleção de células tronco e acelerar o processo de envelhecimento) (Kirstetter et al. 2006).

No que concerne a outras funções do gene, estudos mostraram que a proteína *KL* tem grande importância na biologia do óxido nítrico (Saito et al. 1998; Nagai et al. 2000; Nakamura et al. 2002), expressão de moléculas de adesão quando sob

processo inflamatório (Maekawa et al. 2009) e controle do estresse oxidativo (Yamamoto et al. 2005).

Em relação ao NO, em 1998, Saito et al. estudaram a vasodilatação em animais submetidos a estímulo da acetilcolina. Perceberam que aqueles mutados para o *KL* apresentaram vasodilatação inferior aos animais selvagens. Além disso, mediram nitrato e nitrito na urina, metabólitos do NO, observando concentrações bem menores nos animais com a mutação, o que sugere menor produção endógena. Além disso, realizaram parabiose (conexão cirúrgica) entre os animais selvagens e os mutados e observaram que estes apresentaram melhores respostas à vasodilatação, o que suporta a ideia de que o *KL*, atuando de modo humoral, ao ser passado para os animais mutados, proporcionou a produção do NO. Outros estudos reproduziram esses achados (Nagai et al. 2000; Nakamura et al. 2002; Majumdar et al. 2011). O mecanismo pelo qual *KL* atua nessa regulação ainda é alvo de constantes pesquisas, entretanto trabalho de Richter et al. (2016) sugere que a atuação do FGF-23 induz uma cascata de sinalização intracelular que é responsável pela síntese de NO e, como a ligação do FGF-23 ao seu receptor é regulada pelo *KL*, daí a importância do *KL* na produção desse vasodilatador (Richter et al. 2016).

No que diz respeito à expressão de moléculas de adesão quando sob estímulo inflamatório, Maekawa et al. (2009) realizaram estudo no qual aplicaram, a células endoteliais de cordão umbilical humano, TNF- α (citocina pró-inflamatória), percebendo grande aumento na expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1. Ao administrarem TNF- α e *KL*, observaram expressiva redução nos níveis de RNA mensageiro dessas moléculas adesivas, levando à conclusão de que *KL* tem importante papel na supressão de sua expressão, que é normalmente aumentada quando há estímulo inflamatório.

Além disso, estudos mostram que *KL* circulante atua inibindo a via de sinalização insulina/fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1) por evitar a autofosforilação de seus receptores, impedindo, assim, a propagação do sinal (Kurosu et al. 2005). A moderada regulação da ativação da sinalização das vias insulina/IGF1 é um mecanismo conservado de supressão do envelhecimento (Tatar et al. 2003). Essa regulação limita a fosforilação da serina-treonina quinase Akt, a qual fosforila os fatores de transcrição FOXO (do inglês *mammalian forkhead box O*), importantes na expressão de enzimas antioxidantes, como catalase e MnSOD2 (manganese superóxido dismutase 2). Se há deficiência de *KL*, há prejuízo na expressão dessas

enzimas antioxidantes, fator este que contribui para o estresse oxidativo, aliado ao fato de que a menor produção de NO também aumenta os danos oxidativos (Kurosu et al. 2005; Yamamoto et al. 2005; Wang e Sun 2009b).

Com tantas funções descritas, muitos estudos foram realizados avaliando se a expressão de KL estava alterada em diversos processos patológicos, encontrando, por exemplo, menor quantidade de proteína circulante ou menores níveis de mRNA em diversas condições clínicas, como doenças cardiovasculares (Semba et al. 2011; Keles et al. 2016) e nefropatias (Kacso et al. 2012).

No que tange à anemia falciforme, *KL* também se mostrou como interessante alvo de estudo, pois está envolvido em pontos importantes na fisiopatologia da doença, como estresse oxidativo, produção de óxido nítrico, inflamação e adesão vascular (Conran et al. 2009). Diante disso, estudos investigando polimorfismos neste gene foram realizados a fim de avaliá-lo quanto à possível modulação na doença (Nolan et al. 2004; Baldwin et al. 2005; Nolan et al. 2006; Ashley-koch et al. 2008; Galarneau et al. 2013; Souza et al. 2015).

2.2.3. Estudos na AF

Após a descrição da importância do *KL*, ele se tornou um gene alvo nas pesquisas em busca de moduladores da AF. Dessa forma, diversos trabalhos foram desenvolvidos buscando variações nesse gene que possam estar relacionadas com a heterogeneidade fenotípica dos indivíduos.

Baldwin et al. (2005) realizaram um estudo com polimorfismos em genes que eles hipotetizaram estar associados com o desenvolvimento da osteonecrose. Ao todo, dez *SNPs* em *KL* (rs480780, rs211235, rs149860, rs685417, rs516306, rs565587, rs211239, rs211234, rs2238166, rs499091, rs576404) mostraram-se associados à ocorrência da complicação estudada, sendo justificado o achado pela ação desse gene no metabolismo ósseo que, com a deficiência de *KL*, pode estar desregulado.

Nolan et al. (2004), por sua vez, encontraram associação de polimorfismos em *KL* (rs2249358 e rs211239) com o desenvolvimento de priapismo, sendo justificado pela atuação desse gene no metabolismo do óxido nítrico, importante fator na ocorrência dessa manifestação. Em 2006, o mesmo grupo estudou polimorfismos

em *KL* (rs685417 e rs516306) na ocorrência de úlceras maleolares e também foi encontrada associação.

Trabalhos de Martinez-Castaldi et al. (2007) e Ashley-Koch et al. (2008) também investigaram polimorfismos no *KL* em associação com complicações clínicas. Aquele encontrou associação com rs2149860 e rs656525 com a ocorrência de STA, enquanto este associou a maior frequência de hipertensão pulmonar nos indivíduos falciformes com o polimorfismo rs1888057.

Nenhum desses estudos, porém, buscou avaliar se a expressão do gene estava relacionada com os polimorfismos estudados e/ou com as complicações clínicas apresentadas pelos indivíduos.

Devido, então, à importância do *KL* em mecanismos fisiológicos importantes na fisiopatologia da AF, polimorfismos que possam comprometer a expressão e/ou função de sua proteína podem estar relacionados à modulação da fisiopatologia da doença. Assim, este trabalho buscou avaliar a associação de polimorfismos nesse gene, tal como sua expressão, com as variáveis clínicas e laboratoriais de indivíduos com AF acompanhados na Fundação Hemope em Recife.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de polimorfismos do gene *KL* (rs211239 (A>G) e rs685417 (G>A)) e seus níveis de expressão buscando correlacionar os dados encontrados com a frequência das principais complicações clínicas em indivíduos com anemia falciforme.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Levantar dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope, avaliando a frequência de complicações clínicas e os dados laboratoriais e moleculares dos respectivos indivíduos;

2. Determinar a frequência dos polimorfismos rs211239 (A>G) e rs685417 (G>A) do gene *KL* nos indivíduos com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope e investigar a associação deles com a ocorrência ou não das principais complicações clínicas nos indivíduos estudados;

3. Determinar os níveis de expressão do gene *KL*, buscando correlacionar os resultados encontrados com os *SNPs* estudados e as principais complicações clínicas apresentadas pelos indivíduos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo coorte transversal retrospectivo com comparação de grupos. A amostra analisada é composta por indivíduos com anemia falciforme, não aparentados, de ambos os sexos, acompanhados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), em Recife/PE.

Após análise de 747 indivíduos por meio dos relatos encontrados em seus prontuários, 44 foram excluídos do estudo por não fazerem acompanhamento ambulatorial regular, de modo que 703 foram selecionados. Dos prontuários, foram colhidas informações sobre os respectivos cursos clínicos e dados laboratoriais, sendo realizada a divisão de indivíduos em grupos com e sem complicações clínicas.

4.2. DEFINIÇÃO DE GRUPOS

Indivíduos com AF, sem limites de idade, que apresentaram as principais complicações clínicas da doença compuseram os diferentes subgrupos “caso”. Indivíduos com AF, acima de 18 anos e sem relato das principais complicações, por sua vez, compuseram o grupo controle.

- a) Grupo de indivíduos “caso”: Indivíduos que manifestaram as condições clínicas principais e mais debilitantes (doença cerebrovascular, osteonecrose, priapismo, STA e úlceras de perna) foram divididos em diferentes subgrupos, a saber:
 - a. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram doença cerebrovascular (DCV): composto por indivíduos que apresentam registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica consequente de acidente vascular cerebral (AVC) e por indivíduos com elevada faixa de risco para ocorrência de AVC determinada pela alta velocidade detectada pelo DTC. Neste grupo não foram incluídos indivíduos com histórico de comorbidades que podem levar à ocorrência do AVC, como hipertensão arterial, a fim de restringir os indivíduos “caso” àqueles em que a complicação esteja de fato relacionada à doença de base. Também não foram incluídos indivíduos com

outras complicações neurológicas, como síndrome moya-moya e crises convulsivas;

- b. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram osteonecrose: composto por indivíduos que apresentam exames de ressonância magnética e/ou raio-X mostrando lesão óssea, além de queixas ósseo-articulares e diagnóstico confirmado por ortopedista;
- c. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram priapismo: composto por indivíduos do sexo masculino que apresentaram registro único ou recorrente de priapismo relatado em prontuário;
- d. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram STA: composto por indivíduos que apresentaram evento de síndrome torácica aguda com comprovação por exame de raio-X evidenciando a presença de infiltrado pulmonar, como proposto por Vichinsky e cols. (1997);
- e. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram úlceras de perna: composto por indivíduos que apresentaram relatos médicos de desenvolvimento de úlceras de perna.

As demais complicações clínicas, como nefropatia e cardiopatia, por exemplo, não foram agrupadas em subgrupos “caso” pelo fato de que sua etiologia é mais fortemente influenciada por fatores alheios à anemia falciforme (como alimentação e hábitos de vida) e por não haver registros detalhados como no caso das principais complicações acima citadas.

- b) Grupo de indivíduos “controle”: Grupo de indivíduos com AF acima de 18 anos, não aparentados, que, até a censura do estudo, não apresentaram complicações clínicas que possam ter etiologia decorrente da doença de base, como proposto por Ballas e cols. (2010). Desse modo, foram excluídos indivíduos com todas as complicações encontradas no grupo caso e também aqueles que apresentam relato de nefropatia, hipertensão arterial pulmonar, problemas cardíacos, sequestro esplênico e dactilite. Esse grupo foi usado como controle frente às manifestações dos diferentes subgrupos caso. Em relação aos controles frente à manifestação priapismo, foram usados os indivíduos do sexo masculino deste grupo.

É importante ser dito também que os indivíduos, independentemente de serem do grupo caso ou controle, foram analisados ainda por dois outros parâmetros: de acordo com o número de crises vaso-oclusivas (CVOs) passíveis de internação

reportadas ao ano e de acordo com o número de complicações apresentadas dentre aquelas que compõem os subgrupos caso.

Além disso, para as análises de expressão gênica, o estudo contou com um grupo de 35 indivíduos sem anemia falciforme (com padrão de hemoglobina normal – HbAA), acima de 18 anos, de ambos os sexos, que serviram como referência para cálculo de expressão relativa do gene *KL*.

De todos os indivíduos participantes, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram realizadas coletas de amostras de sangue para realização de análises moleculares. Essa coleta deu-se por recrutamento através de telefonemas ou durante as consultas ambulatoriais de rotina. Cerca de 8,0 mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para extração de DNA e RNA para realização dos experimentos. É importante saber que as coletas ocorreram quando os indivíduos com AF estavam em seu estado basal, como proposto por Ballas e cols. (2010): sem crises de dor e sem processos infecciosos nem inflamatórios em um período prévio de quatro semanas; sem admissão hospitalar em até três dias que antecederam a coleta e sem transfusões sanguíneas em um período de 90 dias. No que diz respeito aos indivíduos sem AF, as coletas também foram realizadas em adultos sem sinais de infecções ou inflamações num período prévio de 4 semanas.

4.3. ANÁLISE LABORATORIAL

As análises dos dados laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação de hemoglobinas) foram obtidos dos resultados de exames de rotina, fixados nos prontuários médicos. A quantificação das hemoglobinas (HbF, HbS e HbA₂) foi realizada 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, no caso dos indivíduos que fazem uso do fármaco.

4.4. ANÁLISES MOLECULARES

As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde foram processadas para que as análises moleculares pudessem ser realizadas.

4.4.1. Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico, necessário para determinação dos moduladores clássicos e para genotipagem dos polimorfismos de *KL*, dos indivíduos foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificada (Davis et al. 1986), que consiste em promover a extração de DNA de sangue periférico utilizando 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 nucléicos permanecem na fase aquosa. 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 nucléicos precipitam-se e possam ser separados facilmente por centrifugação.

Essa técnica deu-se, detalhadamente, da seguinte maneira: 4,0 mL de sangue foram centrifugados a 3.000 rpm durante 10 minutos para que houvesse separação do plasma e ele pudesse ser descartado, restando apenas a parte celular. Os eritrócitos foram, então, lisados pela chamada solução de lise, que é uma mistura de soluções contendo NH_4Cl 0,144M e NH_4HCO_3 0,01M que tem por finalidade lisar os eritrócitos, e, após centrifugação a 2.200 rpm por 10 minutos, 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 50 μl de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 2.200 rpm por 10 minutos e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado, obtendo-se, dessa forma, o precipitado de leucócitos, dos quais foi extraído o DNA.

Para lisar os leucócitos, adicionou-se 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 a mistura foi incubada a 55°C durante 45 minutos. Após esse período, adicionou-se 180 μl de NaCl 5M à solução, a qual foi mantida à temperatura ambiente por 15 minutos. Passado esse tempo, centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi 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 transferido para um novo tubo, no qual adicionou-se acetato de sódio

3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, seguido novamente de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação para precipitação do DNA, seguida de descarte do etanol. Após essa última etapa, o tubo foi colocado para secagem e, quando seco, o DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e teve sua integridade analisada em gel de agarose 1,0%.

a. Caracterização dos indivíduos quanto aos moduladores clássicos da anemia falciforme

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'). Nessa reação, 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. 1992).

b. Análise molecular dos polimorfismos em *Klotho*

Para este estudo, foram selecionados, com auxílio do *software* *SNPBrowser* versão 4.0. os polimorfismos intrônicos *KL* rs211239 (A>G) e *KL* rs685417 (G>A). Os critérios para seleção foram que os polimorfismos fossem do tipo *TagSNPs* e que apresentassem *MAF* (do inglês, *minor allele frequency*) superior a 10% nas populações caucasiana e africana, as quais contribuíram para a formação étnica de nosso país. Além disso, Nolan et al. (2005), Baldwin et al. (2005) e Nolan et al. (2006) encontraram, em suas populações de estudo, associação desses polimorfismos com complicações clínicas em indivíduos com AF. O *KL* rs211239 marca o *SNP* *KL* rs499091 (A>G), enquanto o *KL* rs685417 marca os seguintes polimorfismos em *KL* rs577912 (T>G), rs7982726 (T>C), rs569546 (G>A), rs8000084 (C>T), rs8001148 (A>G), rs9536254 (T>G), rs9526990 (A>G), rs1207362 (G>T), rs9526998 (G>A), rs567170 (C>G), rs625774 (A>T), rs573406 (G>T), rs2772368 (A>G), rs2516571 (G>A), rs2320762 (T>G), rs520103 (T>A).

A genotipagem dos indivíduos para o polimorfismo *KL* rs211239 (A>G) ocorreu por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de análise de fragmentos de restrição (RFLP) utilizando a enzima *MspI*. Para confirmar a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. Após este passo, as amostras foram submetidas à análise de restrição com a enzima *MspI* durante 24h a 37°C em banho-maria seco e os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3%. Para interpretação dos resultados, foi utilizada a informação de que o sítio de ação dessa enzima é em uma região com a sequência nucleotídica CCGG, logo realiza o corte no alelo que contém o polimorfismo. Desse modo, indivíduos GG sofrem clivagem nos dois alelos e apresentam, no gel, fragmento de 223pb, enquanto indivíduos AA não apresentam o sítio de restrição, apresentando, no gel, fragmento do mesmo tamanho do amplificado: 244pb. Na tabela 2 está descrita a sequência dos *primers* utilizados nesta reação, tal como a enzima utilizada na digestão e seus respectivos fragmentos; e, nas tabelas 3 e 4, a composição da reação e sua ciclagem, respectivamente.

Tabela 2: *Primers* utilizados para amplificação da região que compreende o polimorfismo *KL* rs211239 (A>G), mostrando o tamanho da região amplificada, tal como a enzima de restrição utilizada para as análises de tamanho de fragmento.

Sequência dos <i>primers</i>	Direção	Produto	Enzima	Fragmentos
CACATTGTTTTTTGAAGGTTCC TTCTATGTGCAAAAGCCGTG	S* AS*	244pb	<i>MspI</i>	223pb+21pb

*S: Sense; AS: Antisense.

Tabela 3: Composição da reação para amplificação da região polimórfica do *KL* rs211239 (A>G).

Componentes	Volume (µL)
H ₂ O	23,6
Tampão 10x	3,0
MgCl ₂	1,2
dNTPs	0,5
<i>Primer S</i>	0,5
<i>Primer AS</i>	0,5
TaqPol	0,2
Volume final	29,5

Tabela 4: Condições da reação utilizada para amplificação da região do polimorfismo *KL* rs211239 (A>G).

Desnaturação inicial		Desnaturação (35x)		Anelamento (35x)		Extensão (35x)		Extensão final	
T °C	Tempo	T °C	Tempo	T °C	Tempo	T °C	Tempo	T °C	Tempo
96	2'	96	30"	56	30"	72	1'	72	5'

A detecção do polimorfismo *KL* rs685417 (G>A), por sua vez, foi feita por PCR em tempo real (RT-qPCR) por discriminação alélica utilizando o sistema *TaqMan*®, que consiste em sondas marcadas com fluorocromos desenhadas especificamente para serem complementares à cadeia de oligonucleotídeos. As sondas utilizadas no estudo foram VIC (*yellow*) e FAM (*green*) e os *primers* utilizados para pesquisa dos polimorfismos estão disponíveis para o uso em pesquisa de caráter científico no site (<https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C__2983081_10). Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália).

Para cada amostra, a reação foi preparada por 3,125µL de água, 0,625µL de *primer*/sonda, 6,25µL de master *mix* e 2,5µL de DNA; e a ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi definido o *threshold* para análise, plotando-se os sinais de fluorescência para cada amostra e assim discriminando os alelos presentes, conforme recomendações do fabricante (*Life Technologies*, Califórnia, USA).

4.4.2. Extração do RNA a partir dos leucócitos totais e síntese do DNA complementar (cDNA)

Os outros 4 mL de sangue foram utilizados para extração do RNA a partir dos leucócitos totais: os eritrócitos foram lisados a partir de incubação por 15 minutos no gelo com solução de lise de eritrócitos gelada (0,144 mol/l NH₄Cl, 0,01 mol/l NH₄HCO₃) e após a incubação foram centrifugadas a 1.600 rpm por 10 minutos a 4°C. O *pellet* remanescente foi lavado com solução tampão fosfato salina a 1X gelada (PBS) e após centrifugação seguindo o padrão anterior, foram adicionados 250 µl de PBS mais 750 µl reagente Trizol® (Invitrogen, EUA) ao *pellet* obtido. A extração foi

procedida seguindo a técnica de Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987).

As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, Inc, Rockland, DE) e a integridade foi avaliada através de gel de agarose desnaturante a 1,5%. O material utilizado na preparação (cuba de eletroforese e vidrarias) foram previamente tratadas com peróxido de hidrogênio a 3%. O gel foi preparado com água tratada com DEPC, seguindo as recomendações de Liu et al. (2015) para avaliação de integridade. A síntese do DNA complementar (cDNA) partiu de uma solução contendo 1µg de RNA em 10µL, com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems*, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

a. Análise do perfil de expressão relativa de *KL*

A partir do cDNA sintetizado, foi realizado o ensaio de expressão gênica por PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR). Os experimentos foram realizados em duplicata em placas ópticas MicroAmp de 96 poços utilizando o equipamento Aria MX (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA); o gene utilizado como controle endógeno foi o *GAPDH* humano (Número de catálogo: #4310884E; *Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA); e a expressão relativa de *KL* foi quantificada utilizando o *TaqMan® Gene Expression Assay* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Cada reação continha 20 µL de volume final, sendo 10 µL de 2X Master Mix Universal TaqMan, 200 ng de cDNA e 1 µL de 20X dos *primers* e suas sondas. Cada sonda específica (capaz de diferenciar todos os transcritos de *KL* e do controle endógeno *GAPDH*) (*KL* ID do ensaio: Hs00934627_m1) foi marcada com o fluoróforo FAM e seu quencher não-fluorescente. A ciclagem para os ensaios foi inicialmente 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Nos casos de discrepância igual ou superior a 1 ciclo dos valores de ciclo de *threshold* (Ct) entre as duplicatas, uma terceira reação foi realizada. O método comparativo do ΔCt foi usado para determinar a expressão relativa de *KL*. Resumidamente, a diferença no número de Ct ($\Delta Ct = Ct_{KL} - Ct_{GAPDH}$) foi calculado para cada replicata. Amplificações gênicas não detectadas até o ciclo de número 40, tiveram valor igual a zero (0). A expressão de *KL* foi calculada relativa a

um cDNA de referência (composto pelo *pool* de amostras dos indivíduos saudáveis HbAA). Os valores de quantificação relativa de *KL* foram expressos de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{indivíduoAF}} - \Delta C_{t\text{referência (HbAA)}}$ (Livak & Schmittgen 2001). Os resultados obtidos a partir desse experimento foram utilizados para analisar a possível associação dos níveis de expressão de *KL* com as principais complicações clínicas da AF e com os genótipos dos polimorfismos estudados. Além disso, foi avaliado se havia diferença de expressão entre os indivíduos HbAA e HbSS.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. O teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas, enquanto que os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento. Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de Gray utilizado para a comparação das curvas (Kim 2007). 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)*.

4.6. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE (Nº do parecer: 035/10) (Anexo A). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os participantes e os responsáveis daqueles menores de 18 anos, após entrevista, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COM AF

A mediana de idade dos 703 indivíduos com AF incluídos no estudo foi de 26 anos, com intervalo de 4 – 62 anos. Deles, 165 (23,47%) eram menores de 18 anos, com mediana de idade 13 anos, constituindo o grupo pediátrico; e 538 (76,53%), maiores de idade, constituindo o grupo adulto, com idade mediana de 29 anos. Nas tabelas 5 e 6 estão compiladas as características laboratoriais e clínicas da amostra populacional estudada.

Tabela 5: Características laboratoriais dos indivíduos com anemia falciforme incluídos no estudo.

Dado laboratorial	Valor
RBC** (x10¹² células/μL)	
(media) mediana	2,53
Intervalo	1,29 – 4,68
Hb (g/dL)	7,7
Intervalo	4,2 – 11,6
Ht (%)	23,3
Intervalo	12,1 – 35,1
VCM (fL) mediana	91,7
Intervalo	62,6 – 137,3
HCM (g/dL), mediana	30,7
Intervalo	19,8 – 46,4
HbF (%) mediana	7
Intervalo	0,5 – 28,5
Contagem de Reticulócitos (%) , mediana	9,6
Intervalo	0,4 – 29
Contagem de Leucócitos (x10⁶/L) , mediana	12,1
Intervalo	4,2 – 34,1
Contagem de Plaquetas (x10⁹/L) , mediana	416
Intervalo	116 – 1.016
BT (mg/dL), mediana	2,82
Intervalo	0,07 – 37,02
BI (mg/dL), mediana	2,14
Intervalo	0,04 – 36,19
LDH (U/L), mediana	827
Intervalo	192 – 3692
AST (U/L), mediana	43
Intervalo	11 – 235
**RBC: do inglês <i>red blood cells</i> - Hemácias.	

Tabela 6: Caracterização clínica dos indivíduos com anemia falciforme incluídos no estudo.

Características clínicas dos indivíduos com AF incluídos no estudo	N (%) (N total= 703)
Sexo	
Feminino	359 (51%)
Masculino	344 (49%)
Idade	
Intervalo (anos)	4 – 62
Mediana (anos)	26
Indivíduos que fazem uso de hidroxiuréia	323 (46%)
Indivíduos que desenvolveram Nefropatia	39 (5,5%)
Indivíduos que desenvolveram Complicações cardíacas	99 (14%)
Indivíduos que desenvolveram Hipertensão arterial pulmonar	11 (1,5%)
Indivíduos que desenvolveram Dactilite	63 (9%)
Indivíduos que desenvolveram Sequestro esplênico	66 (9,4%)
Indivíduos que desenvolveram Colelitíase	400 (56,9%)
CVO	
<3x/ano	379 (54%)
>3x/ano	270 (38,4%)
>6x/ano	54 (7,6%)
Indivíduos que desenvolveram DCV	123 (17,5%)
Intervalo de idade (anos)	1 – 42
Mediana (anos)	8
Indivíduos que desenvolveram outras complicações neurológicas	72 (10,2%)
Indivíduos que desenvolveram osteonecrose	84 (11,9%)
Intervalo de idade (anos)	8 – 51
Mediana (anos)	25
Indivíduos que desenvolveram úlceras de perna	140 (19,9%)
Intervalo de idade (anos)	4 – 53
Mediana (anos)	21
Indivíduos que desenvolveram Priapismo	95 (27,6%*)
Intervalo de idade (anos)	4 – 39
Mediana de idade (anos)	18
Indivíduos que desenvolveram STA	91 (13%)
Intervalo de idade (anos)	4 – 47
Mediana de idade (anos)	21
Número de complicações dentre as 5 principais	
0	353 (50,2%)
1	247 (35,1%)
2 ou mais	103 (14,7%)
Controles	123 (17,5%)
Intervalo de idade (anos)	18 – 53
Mediana (anos)	28
*Porcentagem considerando apenas indivíduos do sexo masculino	

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS QUANTO AOS MODULADORES CLÁSSICOS DA ANEMIA FALCIFORME

Dos 703 indivíduos, 695 foram genotipados para determinação dos haplótipos β^s e 696 foram genotipados para avaliação da co-herança com a talassemia α . Observou-se que a composição haplotípica mais prevalente na população de estudo é o CAR/CAR, o qual está presente em 391 indivíduos (56%). As demais combinações haplotípicas entre CAR e outro haplótipo foram encontradas em outros 249 indivíduos (35,8%). Os haplótipos menos frequentes na população estudada foram SAUDI, CAM e SEN, os quais mostraram-se presentes em 9 indivíduos (1,3%). Em relação à co-herança com talassemia α , 19 (2,7%) mostraram a mutação em homozigose ($-\alpha/-\alpha$) e 147 (21,1%) em heterozigose ($-\alpha/\alpha$).

5.3. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE *KLOTHO*

Dos 703 indivíduos AF incluídos no estudo, as pesquisas dos polimorfismos rs211239 (A>G) e rs685417 (G>A) foram realizadas em 698 (99%) e 666 (94,7%) indivíduos, respectivamente. Foi observado que as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas e alélicas podem ser observadas na tabela 7.

Tabela 7: Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados.

<i>Polimorfismo</i>	<i>Genótipos</i>	<i>Frequência genotípica (N e %)</i>	<i>Alelos</i>	<i>Frequência alélica (%)</i>
rs211239 (A>G)	AA	268 (38,4%)	A	62,7%
	AG	339 (48,6%)		
	GG	91 (13%)	G	37,3%
rs685417 (G>A)	GG	115 (17,3%)	G	41%
	GA	317 (47,6%)		
	AA	234 (35,1%)	A	59%

Na tabela 8, é possível observar o número de indivíduos dos diferentes grupos (casos e controles) que foram genotipados. A porcentagem mostrada diz respeito ao respectivo grupo (por exemplo, a porcentagem de indivíduos genotipados dentro do grupo controle; dentro do grupo DCV; e assim por diante). É importante notar que a soma não chega a 703, pois há indivíduos de nossa coorte que não entraram em nenhum desses grupos.

Tabela 8: Número de indivíduos genotipados para os diferentes polimorfismos.

	rs211239 (A>G)		rs685417 (G>A)	
	Nº	%	Nº	%
Controles	123	100	118	96
DCV	122	99,2	120	97,6
Osteonecrose	84	100	84	100
Úlceras de perna	140	100	138	98,6
STA	89	97,8	88	96,7
Priapismo	95	100	94	99

5.3.1. Associação dos SNPs estudados com a ocorrência das principais complicações na AF

Para o estudo de associação de ambos os polimorfismos, foram empregados os modelos de herança dominante, co-dominante, recessivo e sobredominante para avaliar o que melhor se adequava à população de estudo.

Independente do modelo empregado, não foram encontradas associações entre o *SNP* rs211239 (A>G) e as principais complicações clínicas dos indivíduos com AF. Em relação às variáveis laboratoriais, houve associação com a concentração de bilirrubina total, sendo os indivíduos homozigotos variantes (GG) os que apresentaram maiores concentrações desse metabólito ($p = 0,012$). Na tabela suplementar 1, é possível observar o modelo co-dominante aplicado, a fim de mostrar a caracterização frente aos três genótipos.

Em relação ao *SNP* rs685417 (G>A), ao aplicar o modelo de associação dominante, no qual o genótipo homozigoto ancestral (GG) é analisado *versus* os genótipos heterozigoto (GA) e homozigoto variante (AA), observou-se que os indivíduos portadores do genótipo selvagem (GG) apresentaram menor frequência de doença cerebrovascular, menos crises vaso-oclusivas e também um menor número de complicações quando comparados aos indivíduos que apresentam os outros genótipos. Os demais modelos também foram testados, mas este foi o que melhor se

aplicou aos resultados do trabalho, sendo todos os resultados expostos correspondentes a ele.

No que diz respeito à frequência das CVOs, observou-se que, de 52 indivíduos que apresentaram mais de 6 crises ao ano, apenas 16 (30%) apresentam o genótipo GG, enquanto 36 (70%) apresentam o alelo variante em hetero ou homozigose ($p=0,006$).

Em relação ao número de complicações apresentadas dentre as 5 principais, observou-se que, de 103 indivíduos com 2 ou mais manifestações, 18 (17,5%) apresentavam genótipo GG e 85 (82,5%) apresentavam os demais genótipos ($p=0,029$).

Quanto à frequência de doença cerebrovascular, por sua vez, foi observado que, de 120 indivíduos com essa complicação, 11 (9,2%) apresentavam genótipo GG e 109 (90,8%), GA ou AA ($p=0,017$; OR=0,395; IC (95%)= 0,184 – 0,850).

Ao realizar a análise da frequência do alelo polimórfico (A) frente a esses três grupos (número de CVOs, número de complicações e frequência de DCV), observou-se que ele não se mostrou associado com o nº de complicações ($p=0,09$) nem com a frequência de DCV ($p=0,07$; OR: 0,7; IC (95%): 0,48 – 1,02). Por outro lado, mostrou-se associado com o nº de CVOs ($p=0,013$).

Os resultados de análise do modelo dominante frente às variáveis clínicas e laboratoriais dos indivíduos que foram genotipados são encontradas na tabela 9.

Tabela 9: Modelo dominante de herança genética do polimorfismo rs685417 (G>A).

Características	Número de indivíduos		Homozigoto ancestral (GG)		Heterozigoto e homozigoto variante (GA + AA)		OR (IC 95%)	p-valor
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Sexo							1 (ref.) 0,97 (0,65 – 1,455)	p = 0,92
Masculino	338	50,7	59	17,4	279	82,6		
Feminino	328	49,3	56	17,1	272	82,9		
Sobrevida							1 (ref.) 0,51 (0,18 – 1,47)	p = 0,281
Vivos	626	94	111	17,7	515	82,3		
Óbitos	40	6	4	10	36	90		
Presença de talassemia α							1 (ref.) 1,1 (0,69 – 1,76)	p = 0,717
Normal	501	76	84	16,8	417	83,2		
Variante ¹	159	24	29	18,2	130	81,8		
Haplótipo							1 (ref.) 0,78 (0,521 – 1,173)	p = 0,252
CAR/CAR	371	43,7	58	15,6	313	84,4		
Outros	287	56,3	55	19,1	232	80,1		
RBC ($\times 10^{12}$ células/μL) (mediana)	2,53		2,59		2,52			p=0,124
Intervalo	1,29 – 4,68		1,64 – 4,43		1,29 – 4,68			
Hb (g/dL)	7,7		7,9		7,7			p=0,011*
Intervalo	4,2 – 11,6		5,2 – 10,2		4,2 – 11,6			
Ht (%)	23,3		24,3		23,1			p=0,007*
Intervalo	12,1 – 35,1		15,4 – 30,9		12,1 – 35,1			
VCM (fL) mediana	91,7		93,3		91,6			p=0,668
Intervalo	62,6 – 121,7		66,1 – 117,4		62,6 – 121,7			
HCM (g/dL), mediana	30,6		31		30,6			p=0,943
Intervalo	19,8 – 40,9		20,4 – 39		19,8 – 40,9			
Contagem de Reticulócitos (%), mediana	9,6		10,2		9,55			p=0,309
Intervalo	0,4 – 29,2		1,3 – 28		0,4 – 29,2			
Contagem de Leucócitos ($\times 10^6$/L), mediana	12,1		12,3		12			p=0,822
Intervalo	4,2 – 34,1		5,2 – 32,5		4,2 – 34,1			
Contagem de Plaquetas	415,5		406,5		417,5			p=0,470

(x10 ⁹ /L), mediana								
Intervalo	115,7 – 1016		143 – 1016		115,7 – 870			
BT (mg/dL), mediana	2,82		2,46		2,9		p=0,062	
Intervalo	0,07 – 37,02		0,21 – 15,49		0,07 – 37,02			
BI (mg/dL), mediana	2,08		1,8		2,18		p=0,06	
Intervalo	0,04 – 36,19		0,13 – 9,85		0,04 – 36,19			
LDH (U/L), mediana	839		793,5		841		p=0,451	
Intervalo	192 – 3692		192 – 3542		219 – 3692			
AST (U/L), mediana	43		40		43		p=0,107	
Intervalo	11 – 235		12 – 151		11 – 235			
Número médio de CVOs/ano							p=0,006*	
<3	355	53,3	49	13,8	306	86,2		
>3	259	38,9	50	19,3	209	80,7		
>6	52	7,8	16	30	36	70		
Número de complicações							p=0,029*	
0	205	37,4	44	21,5	161	78,5		
1	240	43,8	29	12	211	88		
2 ou mais	103	18,8	18	17,5	85	82,5		
DCV							1 (ref.) 0,39	p=0,017*
Sim	120	50,4	11	9,2	109	90,8	0,15 – 1,03	
Não	118	49,6	24	20,3	94	79,7		
Osteonecrose							1 (ref.) 0,78	p=0,586
Sim	84	41,6	14	16,6	70	83,4	0,37 – 1,62	
Não	118	58,4	24	20,3	94	79,7		
Úlceras de perna							1 (ref.) 0,70	p=0,324
Sim	138	54	21	15,2	117	84,8	0,37 – 1,34	
Não	118	46	24	20,3	94	79,7		
STA							1 (ref.) 0,68	p=0,361
Sim	88	42,8	13	14,8	75	85,2	0,32 – 1,42	
Não	118	57,2	24	20,3	94	79,7		
Priapismo							1 (ref.) 0,85	p=0,8
Sim	94	68	15	16	79	84	0,33 – 2,2	
Não	44	32	8	18	36	82		

* Diferença estatisticamente significativa (p<0,05);

¹ Presença da deleção -3.7kb (-α 3.7) em homo ou heterozigose.

Em relação à sobrevida global dos indivíduos não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,224$), como mostra a figura 6.

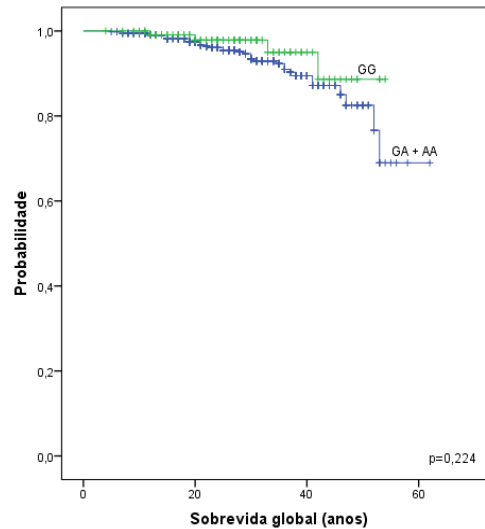


Figura 6: Sobrevida global dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com o modelo de associação dominante do polimorfismo rs685417 (G>A).

Também foi avaliado, entre os indivíduos GG *versus* GA e AA, o tempo decorrido para o desenvolvimento das complicações clínicas. Nessa análise, observou-se que os indivíduos heterozigotos e homozigotos variante (GA e AA) desenvolvem DCV em um menor tempo quando comparados aos indivíduos de genótipo selvagem (GG) (os dados de idade de desenvolvimento da DCV estavam disponíveis para 118 dos 123 indivíduos componentes do grupo caso) ($p = 0,004$). O gráfico desse resultado pode ser visto na figura 7. Para as demais complicações estudadas, tal associação não foi encontrada (Osteonecrose: $p=0,12$; UMI: $p=0,3$; STA: $p=0,21$; Priapismo: $p=0,5$).

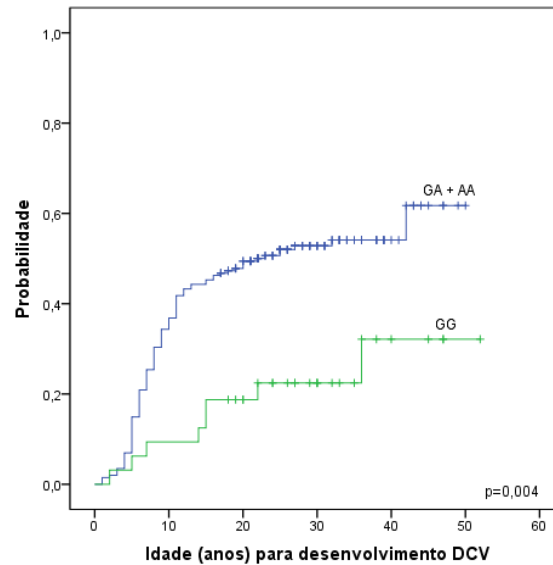


Figura 7: Probabilidade de desenvolvimento de DCV empregando o modelo dominante de análise genética para o polimorfismo rs685417 (G>A).

5.4. ENSAIOS DE EXPRESSÃO DE *KL*

Para os ensaios de expressão, o estudo contou com 74 indivíduos com AF e 35 indivíduos com padrão de hemoglobina normal (HbAA). O grupo de indivíduos com AF apresenta as seguintes características: mediana de idade de 27 anos (variação: 18 – 40 anos), 41 (55,4%) mulheres e 33 (44,6%) homens; no grupo de indivíduos com HbAA, a mediana de idade foi de 24 anos (variação: 20 – 37 anos), 23 (65,7%) eram mulheres e 12 (34,3%), homens. É importante ser dito que se buscou uma coorte de mesma faixa etária visto que estudos mostram que entre crianças, adultos e idosos há diferença na expressão de *KL* (Yamazaki et al. 2010; Ohata et al. 2011). Na tabela 10, é mostrado quantos indivíduos dos diferentes grupos de AF (por complicações clínicas e genótipos dos polimorfismos) foram incluídos nos ensaios de expressão.

Tabela 10: Número de indivíduos incluídos nos ensaios de expressão dos diferentes grupos.

Grupos	N
Indivíduos que desenvolveram DCV	15
Indivíduos que apresentaram STA	14
Indivíduos que apresentaram úlceras maleolares	19
Indivíduos com osteonecrose	10
Indivíduos que apresentaram priapismo	12
Indivíduos do grupo controle	15
Indivíduos com <3 CVOs/ano	34
Indivíduos com >3 CVOs/ano	30
Indivíduos com >6 CVOs/ano	10
rs685417 – GG	12
rs685417 – GA	28
rs685417 – AA	31
rs211239 – AA	35
rs211239 – AG	27
rs211239 – GG	12

As análises não mostraram associação entre os níveis de expressão gênica e os polimorfismos estudados nem com as complicações clínicas. Por outro lado, foi observada diferença significativa entre os grupos de indivíduos HbSS e HbAA, de modo que, nestes, os níveis de expressão mostraram-se aumentados quando comparados aos indivíduos com AF ($p= 0,0001$), como pode ser visto na figura 8.

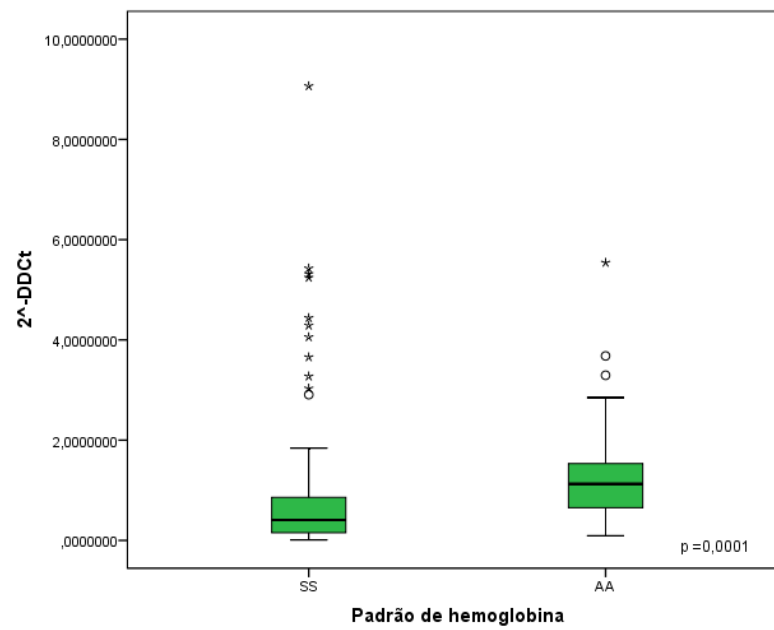


Figura 8: Expressão diferenciada entre indivíduos com padrão de hemoglobina normal (HbAA) e com anemia falciforme (HbSS).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliadas características clínicas, laboratoriais e moleculares de indivíduos com AF acompanhados na Fundação Hemope, tal como a associação de suas características clínicas e laboratoriais com os polimorfismos rs211239 (A>G) e rs685417 (G>A) no gene *KL*. Além disso, foi analisado o perfil de expressão nos diferentes grupos de indivíduos com AF e também entre indivíduos com e sem essa doença.

Os dados laboratoriais dos indivíduos AF estudados refletem os processos hemolítico e inflamatório crônicos comuns à doença. A intensa hemólise mostra-se pelos marcadores LDH e bilirrubinas, que estão aumentados, tal como pela diminuição de concentração de hemoglobina, hematócrito e contagem de hemácias. É possível observar, também, aumento da mediana da contagem de reticulócitos, indicando ativação exacerbada da medula óssea com objetivo de suprir a perda hemolítica. Além desses fatores, percebe-se também elevação na mediana da contagem de leucócitos, corroborando para o fato de que esses indivíduos cursam, de modo geral, com um processo inflamatório crônico (Ballas e Marcolina 2006).

Na coorte estudada observou-se que 640 (92,1%) indivíduos apresentam o haplótipo CAR em hetero (35,8%) ou homozigose (56,3%). Tal frequência está de acordo com dados da literatura, uma vez que Bezerra et al. (2007) mostraram que o haplótipo mais prevalente no estado é o CAR. Outros estados do Brasil, como Rio de Janeiro (Fleury 2007) e Minas Gerais (Leal et al. 2016) também apresentam maior frequência desse haplótipo, que é considerado de maior gravidade (Powars 1991). Também os dados de co-herança com talassemia α , que ocorre em 166 indivíduos (23,8%), acordam com dados da literatura que mostram frequências semelhantes em outras populações de pessoas com AF (Costa et al. 1989; Neonato et al. 2000; Luporini et al. 2001; Belisario et al. 2010).

Em relação à frequência dos polimorfismos estudados, tem-se que é semelhante à disponibilizada no banco de dados do Ensembl: no caso do rs211239, o alelo ancestral (A) é mais prevalente; e, no rs685417, o variante (A) é mais comum.

No que diz respeito aos polimorfismos em *KL* e sua associação com as complicações clínicas dos indivíduos, observou-se que o *SNP KL* rs211239 (A>G) não se mostrou associado com o risco de desenvolvimento de nenhuma delas. Embora

Baldwin et al. (2005) tenham associado a presença desse polimorfismo como fator de risco para a ocorrência de osteonecrose ($p = 0,001$) e Nolan et al. (2004) para a ocorrência de priapismo, na população de estudo deste trabalho esses dados não foram reproduzidos. Assim como os resultados aqui expostos, Elliott et al. e Ulug et al. não encontraram associação desse polimorfismo com priapismo ($p = 0,7$) e osteonecrose ($p = 0,7$), respectivamente (Elliott et al. 2007; Ulug et al. 2009).

A falta de associação deste trabalho frente aos de Baldwin et al. (2005) e Nolan et al. (2004) pode estar relacionada às diferentes populações estudadas, tal como o N amostral e a utilização de diferentes critérios na divisão de grupos caso e controle. Nolan et al. (2004), por exemplo, trabalhou com indivíduos do CSSCD, que são oriundos dos Estados Unidos (que é uma população geneticamente distinta da brasileira), usando mais indivíduos do que os deste estudo: 148 pacientes como casos e 529 controles. Esses controles, entretanto, diferentemente dos utilizados nesta pesquisa, apresentavam idade a partir de 10 anos e o único critério de inclusão no grupo é que não tivessem apresentado episódios de priapismo, podendo haver alguma das outras manifestações. Essa idade de inclusão pode ter levado a um viés nos resultados, uma vez que o primeiro episódio pode ocorrer após essa idade, logo, indivíduos incluídos no grupo controle podem ser, na verdade, possíveis casos (Mantadakis et al. 1999). Assim como Nolan et al. (2004), Baldwin et al. (2005) usou indivíduos oriundos do CSSCD e adotou critérios para seleção de grupos diferentes dos adotados neste trabalho.

No que diz respeito ao polimorfismo *KL* rs685417 (G>A), foram encontradas associações com maior frequência de DCV, maior número de CVOs ao ano, maior número de complicações e menor tempo de desenvolvimento da DCV: indivíduos com genótipos heterozigoto e homozigoto variante (GA e AA) apresentaram mais chances de apresentar essas complicações frente aos indivíduos com genótipo ancestral (GG). Tais associações, entretanto, não foram reportadas anteriormente na literatura. Os trabalhos publicados com esse *SNP* em relação à AF foram: Baldwin et al. (2005), que encontraram associação do genótipo GA com uma maior frequência de osteonecrose; Nolan et al. (2006), que mostraram resultados apontando que indivíduos GA apresentavam maior frequência de úlceras de perna; e Souza et al. (2015), que não reproduziram os achados de Nolan et al. (2006).

A não reprodutibilidade dos achados aqui reportados frente aos trabalhos de Nolan et al. (2006) e Baldwin et al. (2005), assim como justificado para o rs211239

(A>G), pode ser devida ao fato de que as populações são geneticamente distintas e aos diferentes critérios adotados na divisão dos grupos. O trabalho de Souza et al. (2015), realizado com indivíduos brasileiros, assim como este, também não encontrou a associação reportada por Nolan et al. (2006), reforçando o fato de que a composição étnica da população pode impactar os resultados. Quanto às associações aqui reportadas, este trabalho é o primeiro a apresentá-las.

Como o *KL* tem grande importância na homeostase vascular, fatores que alterem a função do seu produto podem levar a falhas nos mecanismos biológicos em que ele participa (Pacheco e Moraes 2009). Por estar envolvido no metabolismo do NO, se houver falha na função de sua proteína, a atuação desse vasodilatador pode ser amplamente comprometida (somada à depleção que já ocorre devido à intensa hemólise que os indivíduos com AF sofrem), aumentando a frequência de complicações (Nolan et al. 2006; Elliott et al. 2007). Além disso, por atuar suprimindo moléculas de adesão, seu comprometimento conduz à maior adesão vascular (Maekawa et al. 2009), podendo esta ser a explicação para o maior número de CVOs nos indivíduos portadores do alelo variante. Tal comprometimento, que pode levar a uma disfunção endotelial (Mencke e Hillebrands 2016; Richter et al. 2016), também pode ser o responsável pelo fato de os indivíduos GA e AA apresentarem maior frequência de DCV, além de apresentarem mais precocemente do que os indivíduos com genótipo selvagem (GG), uma vez que essa complicação clínica tem seu processo fisiopatológico influenciado tanto pela depleção do NO como pela aderência vascular aumentada.

Assim, nossa hipótese é que os genótipos heterozigoto e homozigoto variante (GA e AA) do polimorfismo rs685417 podem comprometer a função do produto gênico, podendo, então, explicar as associações encontradas.

Este trabalho também buscou avaliar diferenças nos níveis de expressão do gene *KL* entre os diferentes grupos de indivíduos com AF e entre indivíduos AF e HbAA, pesquisa essa que não fora realizada em trabalhos anteriores.

Entre os diferentes grupos de indivíduos AF, entretanto, não foram encontradas diferenças significativas: os polimorfismos não se mostraram como agentes que alteram diretamente a expressão de mRNA do gene nem as diferentes complicações mostraram-se com perfil de expressão diferenciado. Por outro lado, as análises mostraram que os indivíduos com AF apresentam menores níveis de expressão quando comparados ao grupo de indivíduos sem essa doença ($p=0,0001$).

Uma possível explicação para esse fato é que o processo inflamatório crônico dos portadores de HbSS diminua os níveis de expressão de *KL*, pois, como reportado em trabalho de Thurston et al. (2010), a presença de citocinas pró-inflamatórias diminui a expressão desse gene (Thurston et al. 2010). Além disso, há trabalhos que sustentam que a inflamação crônica afeta o organismo levando a um processo de envelhecimento precoce (chamado de “*Inflammaging*”) (Fougère et al. 2016; Xia et al. 2016). Unindo essa informação ao fato de que a expressão de *KL* diminui com a idade (Yamazaki et al. 2010), pode ser que os indivíduos AF apresentem um envelhecimento precoce devido ao processo inflamatório e, por isso, os níveis de *KL* se mostrem menores.

Este trabalho, então, mostrou associações inéditas em relação ao *KL* e à clínica da AF. Embora o polimorfismo que se mostrou associado com CVOs, número de complicações e DCV não tenha se mostrado associado com os níveis de expressão do mRNA do gene (tal como as complicações clínicas em si), a importância do trabalho não é diminuída, pois pode ser que a interferência do polimorfismo no produto gênico se dê em uma etapa pós-transcricional.

Dessa forma, é importante que estudos futuros sejam realizados a fim de elucidar como o gene *KL* pode estar modulando a clínica dos indivíduos AF e, assim, possa servir como mais um indicativo prognóstico no acompanhamento clínico deles.

7. CONCLUSÕES

- O polimorfismo *KL* rs211239 (A>G) não se mostrou associado com o desenvolvimento das principais complicações clínicas dos indivíduos com anemia falciforme na amostra populacional estudada;
- O polimorfismo *KL* rs685417 (G>A) mostrou-se, em seus genótipos heterozigoto e homozigoto variante (GA e AA), como fator de risco para a ocorrência de maior número de crises vaso-oclusivas, maior número de complicações clínicas e maior frequência de DCV na amostra populacional estudada;
- Indivíduos com genótipos heterozigoto e homozigoto variante (GA e AA) para o polimorfismo *KL* rs685417 apresentaram DCV em um menor intervalo de tempo quando comparados aos indivíduos GG;
- Os níveis de expressão do gene *KL* não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos dos diferentes genótipos dos polimorfismos pesquisados na amostra populacional estudada;
- Os níveis de expressão do gene *KL* não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos das diferentes complicações clínicas da AF na amostra populacional estudada;
- Os níveis de expressão do gene *KL* mostraram-se diferentes entre os indivíduos com e sem anemia falciforme na amostra populacional estudada

REFERÊNCIAS

- Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT et al. (1998) Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler. *N Engl J Med* 339:5–11.
- Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, Dupuit MF, Almeida MNT, Reis MG and Gonçalves MS (2004) The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin* 28:267–271. doi: 10.1081/HEM-120040310
- Al-Mousawi F, Malki A, Al-Arabi A, Al-Bagali M, Al-Sadadi A and Booz MMY (2002) Total hip replacement in sickle cell disease. *Int Orthop* 26:157–161. doi: 10.1007/s00264-002-0337-5
- Alavi A and Kirsner RS (2015) Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. *Int J Low Extrem Wounds* 14:213–216. doi: 10.1177/1534734615600069
- Almeida A and Roberts I (2005) Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol* 129:482–490. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05476.x
- Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ and Kazazian HH (1984) Origin of the β^S -globin gene in Blacks: The contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:853–856.
- Araújo MCPE de, Serafim ÉSS, Jr WAP de C and Medeiros TMD de (2004) Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad Saude Publica* 20:123–128.
- Armenis I, Kalotycho V, Tzanetea R, Kollia P, Kontogeorgiou Z, Anastasopoulou D, Mantzourani M, Samarkos M, Pantos K, Konstantopoulos K et al. (2017) Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. *Nitric Oxide* 62:17–23. doi: 10.1016/j.niox.2016.11.002
- Ashley-koch AE, Elliott L, Kail ME, Castro LM De, Jonassaint J, Jackson TL, Price J, Ataga KI, Levesque MC, Weinberg JB et al. (2008) Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* 111:5721–5727. doi: 10.1182/blood-2007-02-074849.An
- Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, Ma Q, Sebastiani P, Embury SH, Bisbee A, Farrell J, Farrer L and Steinberg MH (2005) Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood* 106:372–376. doi: 10.1182/blood-2005-02-0548.Supported
- Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-whitley K and Wang WC (2010) Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol* 85:6–13. doi: 10.1002/ajh.21550
- Ballas SK and Marcolina MJ (2006) Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* 46:105–110. doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00679.x
- Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM and Viana MB (2010) Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* 34:516–29. doi: 10.3109/03630269.2010.526003
- Bennett OM and Namnyak SS (1990) Bone and joint manifestations of sickle cell anaemia. *J Bone Jt Surg* 72:494–499.
- Bezerra G, Daher EDF and Rocha FAC da (2012) Osteoarticular involvement in sickle

- cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34:156–164. doi: 10.5581/1516-8484.20120036
- Bezerra MAC, Santos MNN, Araújo AS, Gomes YM, Abath FGC and Bandeira FMGC (2007) MOLECULAR VARIATIONS LINKED TO THE GROUPING OF β - AND α -GLOBIN GENES IN NEONATAL PATIENTS WITH SICKLE CELL. *Hemoglobin* 31:83–88. doi: 10.1080/03630260601057153
- Bloch L, Sineshchekova O, Reichenbach D, Reiss K, Saftig P, Kuro-o M and Kaether C (2010) Klotho is a substrate for α -, β - and γ -secretase. *FEBS Lett* 583:3221–3224. doi: 10.1016/j.febslet.2009.09.009.Klotho
- Cajado C, Cerqueira BA V, Couto FD, Moura-neto JP, Vilas-Boas W, Dorea MJ, Lyra IM, Barbosa CG, Reis MG and Goncalves MS (2011) Cytokine TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (-308G > A and -251A > T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. *Cytokine* 56:312–317. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.002
- Cançado RD and Jesus JA (2007) A doença falciforme no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29:204–206.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Christakis J, Vavatsi N, Hassapopoulou H, Papadopoulou M, Mandraveli K, Loukopoulos D, Morris JS, Serjeant BE and Serjeant GR (1990) Comparison of homozygous sickle cell disease in Northern Greece and Jamaica. *Lancet* 335:637–640.
- Collins FS, Brooks LD and Chakravarti A (1998) A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Res* 8:1229–1231.
- Conran N, Franco-penteado CF and Costa FF (2009) Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 33:1–16. doi: 10.1080/03630260802625709
- Cumming V, King L, Fraser R, Serjeant G and Reid M (2008) Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 142:119–125. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07115.x
- De Ceulaer K, Higgs DR, Hayes RJ and Serjeant BE (1983) α -Thalassemia Reduces the Hemolytic Rate in Homozygous Sickle-Cell Disease. *N Engl J Med* 319:189–190.
- Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J and Rochette J (1992) Rapid analysis of α -3.7 thalassaemia and α α α anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 82:105–111.
- Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, Cunha AF, Santos MN, Albuquerque DM, Fertrin KY, Costa FF, Azevedo RC, Machado CG et al. (2014) Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol* 93:1123–1129. doi: 10.1007/s00277-014-2016-1
- Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz T V and Stiles JK (2009) Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics Insights* 2:23–48.
- Dutra FF and Bozza MT (2014) Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* 5 MAY:1–20. doi: 10.3389/fphar.2014.00115
- Eland IA, Van der Lei J, Stricker BHC and Sturkenboom MJCM (2001) Incidence of

- priapism in the general population. *Urology* 57:970–972. doi: 10.1016/S0090-4295(01)00941-4
- Elliott L, Ashley-koch AE, Castro L De, Jonassaint J, Price J, Ataga KI, Levesque C, Weinberg JB, Eckman R, Orringer EP et al. (2007) Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *Br J Haematol* 137:262–267. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06560.x
- Fertrin KY and Costa FF (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol* 3:443–458.
- Fleury M (2007) Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. *RBAC* 39:89–93.
- Fougère B, Boulanger E, Nourhashémi F, Guyonnet S and Cesari M (2016) Chronic Inflammation: Accelerator of Biological Aging. *journals Gerontol Med Sci* 0:1–8. doi: 10.1093/gerona/glw240
- Franceschi L De, Cappellini MD and Olivieri O (2011) Thrombosis and Sickle Cell Disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 3:
- Galarneau G, Coady S, Garrett ME, Jeffries N, Puggal M, Paltoo D, Soldano K, Guasch A, Ashley-koch AE, Telen MJ et al. (2013) Gene-centric association study of acute chest syndrome and painful crisis in sickle cell disease patients. *Blood* 122:434–443. doi: 10.1182/blood-2013-01-478776.G.L.
- Gualandro SFM, Fonseca GHF and Gualandro DM (2007) Complicações cardiopulmonares das doenças falciformes. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29:291–298.
- Hazmi MAF, Warsy AS, Bashir N, Beshlawi A, Hussain IR, Temtamy S and Qubaili F (1999) Haplotypes of the beta globin gene as prognostic factors in sickle cell disease. 1154–1158.
- Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, Grandison Y, Lowrie Y, Mason KP, Serjeant BE et al. (1982) The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 306:
- Howard J and Davies SC (2007) Haemoglobinopathies. *Paediatr Child Health (Oxford)* 17:311–316.
- Ingram VM (1959) ABNORMAL HUMAN HAEMOGLOBINS. III THE CHEMICAL DIFFERENCE BETWEEN NORMAL AND SICKLE CELL HAEMOGLOBINS. *Biochim Biophys Acta* 36:1–10.
- Kacso IM, Bondor CI and Kacso G (2012) Soluble serum Klotho in diabetic nephropathy: Relationship to VEGF-A. *Clin Biochem* 45:1415–1420. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.07.098
- Kan YW and Dozy AM (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human f-globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5631–5635.
- Kato GJ, Gladwin MT and Steinberg MH (2007) Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood* 21:37–47.
- Keles N, Dogan B, Kalcik M, Caliskan M, Nur N, Aksu F, Bulut M, Kostek O, Isbilen B, Yilmaz Y et al. (2016) Journal of Diabetes and Its Complications Is serum Klotho protective against atherosclerosis in patients with type 1 diabetes mellitus? *J Diabetes Complications* 30:126–132. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.09.013
- Kim HT (2007) Cumulative incidence in competing risks data and competing risks

- regression analysis. *Clin Cancer Res* 13:559–565. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1210
- Kim J, Hwang K, Park K, Kong ID and Cha S (2015) Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. *J lifestyle Med* 5:1–6.
- Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SEW and Nerlov C (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol* 7:1048–1056. doi: 10.1038/ni1381
- Kuro-o M (2012) Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21:362–368. doi: 10.1097/MNH.0b013e32835422ad
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E et al. (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45–51.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H et al. (2005) Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* (80-) 309:1829–1833. doi: 10.1126/science.1112766.Suppression
- Leal AS, Martins PRJ, Balarin MAS, Pereira GA and Resende GAD (2016) Haplotypes β s-globin and its clinical-haematological correlation in patients with sickle-cell anemia in Triângulo Mineiro , Minas Gerais , Brazil. *J Bras Patol Med Lab* 52:5–10.
- Lim K, Groen A, Molostvov G, Lu T, Lilley KS, Snead D, James S, Wilkinson IB, Ting S, Hsiao L et al. (2015) α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 100:1308–1318. doi: 10.1210/jc.2015-1800
- Lindenau JD (2009) Frequência de mutações nos genes das cadeias alfa e beta da hemoglobina no Rio Grande do Sul. 1–19.
- Liu S and Quarles LD (2007) How Fibroblast Growth Factor 23 Works. *J Am Soc Nephrol* 18:1637–1647. doi: 10.1681/ASN.2007010068
- Lovett PB, Sule HP and Lopez BL (2014) Sickle cell disease in the emergency department. *Emerg Med Clin North Am* 32:629–47. doi: 10.1016/j.emc.2014.04.011
- Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JAP, Gesteira M de F, Carvalho MH, Terezinha S, Saad O, Figueiredo MS and Costa FF (2005) Clinical , hematological , and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil Caracterização clínica , hematológica e molecular de crianças portadoras da anemia falciforme em duas diferentes cidades. *Cad Saúde Pública* 21:1287–1290.
- Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, Oguro R, Hanasaki H, Katsuya T and Rakugi H (2009) Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocr* 35:341–346. doi: 10.1007/s12020-009-9181-3
- Majumdar V, Jose D and Christopher R (2011) Influence of Klotho genotypes on plasma NO x levels in South Indian population. *Thromb Res* 128:251–255. doi: 10.1016/j.thromres.2011.04.002
- Mantadakis E, Cavender JD, Rogers ZR, Ewalt DH and Buchanan GR (1999) Prevalence of priapism in children and adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 21:518–522. doi: 10.1097/00043426-199911000-00014
- Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-iida T, Nagai R, Kuro-o M and Nabeshima Y (1998) Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding

- Membrane and Secreted Klotho Protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 630:626–630.
- Mencke R and Hillebrands J-L (2016) The Role of the Anti-Ageing Protein Klotho in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Ageing Res Rev.* doi: 10.1016/j.arr.2016.09.001
- Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH and Ballas SK (2010) Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol* 85:831–833. doi: 10.1002/ajh.21838
- Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Nakamura T, Kurabayashi M and Kuro-o M (2000) Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal. *Cell Mol life Sci* 57:738–746.
- Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Masuda H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Nagai R and Kurabayashi M (2002) Production of Nitric Oxide, but Not Prostacyclin, Is Reduced in Klotho Mice. *Jpn J Pharmacol* 89:149–156.
- Naoum PC (2000) Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 22:5–22.
- Neonato MG, Guilloud-Bataille M, Beauvais P, Begue P, Belloy M, Benkerrou M, Ducrocq R, Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Quinet B et al. (2000) Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. *Eur J Haematol* 65:155–164. doi: 10.1034/j.1600-0609.2000.90210.x
- Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Diego F, Farrell JJ, Sebastiani P and Steinberg MH (2006) Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *Br J Haematol* 133:570–578.
- Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Bisbee A, Embury SH, Farrer LA and Steinberg MH (2004) Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 128:266–272. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05295.x
- Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, Nakayama M, Michigami T, Imura A, Nabeshima Y et al. (2011) Circulating Levels of Soluble α -Klotho Are Markedly Elevated in Human Umbilical Cord Blood. *J Clin Endocrinol Metab* 96:943–947. doi: 10.1210/jc.2010-2357
- Pacheco AG and Moraes MO (2009) Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* 27:173–186. doi: 10.3233/DMA-2009-0654
- Pagnier J, Mearst JG, Dunda-belkhodja O, Schaefer-regot KIME, Beldjord C, Nagelt RL and Labie D (1984) 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* 29:288–290.
- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH and Klug PP (1994) Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330:1639–1644.
- Powars DR (1991) Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Semin Hematol* 28:202–208.
- Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E and Johnson C (2005) Outcome of Sickle Cell Anemia. *Medicine (Baltimore)* 84:363–376. doi: 10.1097/01.md.0000189089.45003.52
- Quinn CT (2013) Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. *Pediatr Clin North Am* 60:1363–81. doi:

10.1016/j.pcl.2013.09.006

- Rees DC, Williams TN and Gladwin MT (2010) Sick cell disease. *Lancet* 376:2018–2031. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X
- Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN and Gladwin MT (2002) Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sick cell disease. *Nat Med* 8:1383–1389. doi: 10.1038/nm799
- Richter B, Haller J, Haffner D and Leifheit-nestler M (2016) Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Eur J Physiol* 468:1621–1635. doi: 10.1007/s00424-016-1858-x
- Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, Matsumura Y, Masuda H, Kurabayashi M, Kuro-o M et al. (1998) Klotho Protein Protects against Endothelial Dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 248:324–329.
- Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Milton JN, Dworkis DA, Melista E, Klings ES, Garrett ME, Telen MJ, Ashley-koch A et al. (2010) Genetic modifiers of the severity of sick cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am J Hematol* 85:29–35. doi: 10.1002/ajh.21572.Genetic
- Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM and Ferrucci L (2011) Plasma Klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatr Soc* 59:1596–1601. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03558.x.Plasma
- Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL, Cançado RD, Salvino MA, Angulo I and Voltarelli JC (2010) Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter* 32:46–53. doi: 10.1590/S1516-84842010005000020
- Singhal R, Chawla S, Rathore DK, Bhasym A, Annarapu GK, Sharma V, Seth T and Guchhait P (2016) Development of pro-inflammatory phenotype in monocytes after engulfing Hb-activated platelets in hemolytic disorders. *Clin Immunol*. doi: 10.1016/j.clim.2016.12.007
- Sommer CK, Goldbeck AS, Wagner SC and Castro SM (2006) Triagem neonatal para hemoglobinopatias : experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul , Brasil. *Cad Saude Publica* 22:1709–1714.
- Sonati M de F and Costa FF (2008) The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *J Pediatr (Rio J)* 84:40–51. doi: 10.2223/JPED.1802
- Souza CRL, Shimamoto MMA, Vicari P, Mecabo G, Arruda MM and Figueiredo MS (2015) Klotho gene polymorphisms and their association with sick cell disease phenotypes. *Rev Bras Hematol Hemoter* 37:275–276. doi: 10.1016/j.bjhh.2015.02.009
- Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity in sick cell anaemia. *Br J Haematol* 129:465–481. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05411.x
- Steinberg MH (2008a) SNPing away at sick cell pathophysiology. *Blood* 111:
- Steinberg MH (2008b) Sick Cell Anemia , the First Molecular Disease : Overview of Molecular Etiology , Pathophysiology , and Therapeutic Approaches. 1295–1324. doi: 10.1100/tsw.2008.157
- Steinberg MH (2009) Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sick Cell Anemia. 46–67. doi: 10.1100/tsw.2009.10
- Steinberg MH and Adewoye AH (2006) Modifier genes and sick cell anemia. *Curr Opin Hematol* 13:131–136.
- Steinberg MH and Embury SH (1986) Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sick cell hemoglobin gene. *Blood* 68:985–990.

- Stram DO (2004) Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol* 27:365–374. doi: 10.1002/gepi.20028
- Sutton M, Boushassira EE and Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta - like globin genecluster haplotypes. *Am J Hematol* 68:985–990.
- Switzer JA, Hess DC, Nichols FT and Adams RJ (2006) Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease : present and future. *Lancet Neurol* 5:501–512.
- Tatar M, Bartke A and Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* (80-) 299:1346–1351.
- Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, Vandewalle A, Besselsen DG, Muhlbauer M, Jobin C et al. (2010) Downregulation of aging-related Klotho gene in experimental colitis: the role of TNF and IFN- γ . *Gastroenterology* 138:1384–1394. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.002.Downregulation
- Ulug P, Vasavda N, Awogbade M, Cunningham J, Menzel S and Thein SL (2009) Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. *Ann Hematol* 88:803–805. doi: 10.1007/s00277-008-0659-5
- Vasconcelos MCM, Nunes MCP, Barbosa MM, Fernandes BM, Passaglia LG, Silva CM and Ferrari TCA (2015) Left ventricular remodeling in patients with sickle cell disease : determinants factors and impact on outcome. *Ann Hematol* 94:1621–1629. doi: 10.1007/s00277-015-2430-z
- Vicari P and Figueiredo MS (2007) Priapismo na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29:275–278.
- Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R et al. (2000) Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 342:1855–1865.
- Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O and Nickerson B (1997) Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. *Blood* 89:1787–1792.
- Wagner SC, Castro SM de, Gonzalez TP, Santin AP, Zaleski CF, Azevedo LA, Dreau H, Henderson S, Old J and Hutz MH (2010) Neonatal Screening for Hemoglobinopathies: Results of a Public Health System in South Brazil. *Genet Test Mol Biomarkers* 14:565–569.
- Wang Y and Sun Z (2009a) Klotho Gene Delivery Prevents the Progression of Spontaneous Hypertension and Renal Damage. *Hypertension* 54:1–17. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134320.Klotho
- Wang Y and Sun Z (2009b) Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev* 8:43–51. doi: 10.1016/j.arr.2008.10.002
- Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, Wan W and Tai X (2016) An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res* 2016:1–12. doi: 10.1155/2016/8426874
- Xu Y and Sun Z (2015) Molecular Basis of Klotho : From Gene to Function in aging. *Endocr Rev* 1–21. doi: 10.1210/er.2013-1079
- Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP et al. (2005) Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. *J Biol Chem* 280:38029–38034.
- Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y et al. (2010) Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement : Age-dependent change of

- soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 398:513–518. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.110
- Zago MA, Junior WAS, Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, Tavella MH, Araujo AG, Krieger JE, Elion J et al. (2000) Atypical Bs haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol* 63:63–79. doi: 10.1002/(SICI)1096-8652(200002)63
- Zago MA and Pinto ACS (2007) Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter* 29:207–214.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1: Modelo codominante de herança genética do polimorfismo rs211239 (A>G).

<i>Características</i>	<i>Número de indivíduos</i>		<i>Homozigoto ancestral (AA)</i>		<i>Heterozigoto (AG)</i>		<i>Homozigoto variante (GG)</i>		<i>P-valor</i>
	Nº	%	Nº	%	N	%	Nº	%	
Sexo									p = 0,003*
Masculino	343	49	110	41	186	55	47	51	
Feminino	355	51	158	59	153	45	44	49	
Sobrevida									p = 0,93
Vivos	659	96	256	96	319	96	84	95	
Óbitos	28	4	10	4	14	4	4	5	
Presença de talassemia α									p = 0,12
Normal	528	76	212	80	248	73,6	68	74,8	
Variante¹	163	24	51	20	89	26,4	23	25,2	
Haplótipo									p = 0,55
CAR/CAR	387	56	141	53,6	192	57	54	59	
Outros	303	44	122	46,4	144	43	37	41	
RBC** (x10¹² células/μL) (mediana)	2,53		2,57		2,51		2,51		p = 0,258
Intervalo	1,29 – 4,68		1,29 – 4,68		1,5 – 4,43		1,5 – 4,1		
Hb (g/dL)	7,7		7,7		7,7		7,8		p = 0,616
Intervalo	4,2 – 11,6		4,2 – 11,6		4,8 – 11,5		4,9 – 10,3		
Ht (%)	23,3		23,7		23,2		23		p = 0,372
Intervalo	12,1 – 35,1		12,1 – 34,1		14,8 – 35,1		14,8 – 32,4		
VCM (fL) mediana	91,7		91,5		92,2		91,3		p = 0,46
Intervalo	62,6 – 125,8		66,1 – 125,8		62,6 – 118		62,7 – 109,3		
HCM (g/dL), mediana	30,6		30,5		30,6		30,7		p = 0,671
Intervalo	19,8 – 40,9		20,4 – 41,3		20,7 – 39,8		19,8 – 36,3		
Contagem de Reticulócitos (%), mediana	9,6		9,9		9,2		10		p = 0,118
Intervalo	0,4 – 29,2		1,5 – 29,2		0,5 – 28		0,4 – 26,7		
Contagem de Leucócitos (x10⁶/L), mediana	12,1		12,1		12		12,3		p = 0,94

Intervalo	4,2 – 34,1		4,2 – 34,1		4,7 – 33,5		4,7 – 25		
Contagem de Plaquetas (x10 ⁹ /L), mediana	420		425		415		447		p = 0,249
Intervalo	115 – 1016		119 – 935		115 – 1016		119 – 870		
BT (mg/dL), mediana	2,82		2,58		2,88		3,29		p = 0,012*
Intervalo	0,2 – 37,02		0,07 – 20,32		0,21 – 37,02		0,31 – 16,4		
BI (mg/dL), mediana	2,095		2		2,16		2,5		p = 0,087
Intervalo	0,13 – 36,19		0,04 – 11,52		0,13 – 36,19		0,27 – 13,5		
LDH (U/L), mediana	828		857		796		822		p = 0,731
Intervalo	192 – 3692		223 – 3692		192 – 2854		219 – 3152		
AST (U/L), mediana	43		43		42		45		p = 0,710
Intervalo	13 – 235		11 – 235		13 – 151		13 – 108		
Número médio de CVOs/ano									p = 0,41
<3	377	54	147	55	188	55	42	46	
>3	267	38	97	36	128	38	42	46	
>6	54	8	24	9	23	7	7	8	
Número de complicações									p = 0,317
0	227	39,5	82	36,2	114	50,2	31	13,6	
1	245	42,6	106	43,3	110	44,9	29	11,8	
2	103	17,9	33	32	55	53,4	15	14,6	
DCV									p = 0,728
Sim	122	49,8	52	52,5	57	48,7	13	44,8	
Não	123	50,2	47	47,5	60	51,3	16	55,2	
Osteonecrose									p = 0,59
Sim	84	41	27	36,5	43	41,7	14	47	
Não	123	59	47	63,5	60	58,3	16	53	
Úlceras de perna									P = 0,98
Sim	140	53	54	53,5	67	52,8	19	54	
Não	123	47	47	46,5	60	47,2	16	46	
STA									P = 0,49
Sim	89	42	41	47	39	39	9	36	
Não	123	58	47	53	60	61	16	64	
Priapismo									P = 0,85
Sim	95	68	32	68	51	70	12	63	

Não	44	32	15	32	22	30	7	37
------------	----	----	----	----	----	----	---	----

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$);

** Do inglês, *red blood cells*;

¹ **Presença da deleção -3.7kb (-α 3.7) em homo ou heterozigose.**

ANEXO A: PROJETO APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 E-eletrônico: cep.hemope@gmail.com	 Governo do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	---	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL: Nº. 035/2010

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme
Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra, Ph.D.
Identidade: 5867375 **CPF:** 987.061.525-20 **Telefone:** 81 – 3182-4711
Endereço: Rua. Antonio Celso Uchoa Cavalcanti- Graças- Recife – PE – CEP: 52050-002
Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE
Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

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

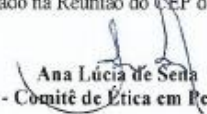
Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de $\alpha_2^{3,7kb}$ talassemia e da triplicação do α ($\alpha\alpha\alpha$) influenciando nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos das Haplótipos β^S com o episódio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

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

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

Homologado na Reunião do CEP de 20/10/2010


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

APÊNDICE A: ARTIGO A SER SUBMETIDO

Revista: *British Journal of Haematology*.

Fator de impacto: 5.812. Qualis CB1: A1.

Association of *KLOTHO* polymorphisms with clinical complications of sickle cell anaemia in patients from Pernambuco, Brazil

Jessica V G F Batista¹, Diego A Pereira-Martins¹, Diego Arruda Falcão¹, Igor de Farias Domingos¹, Rayssa Leal Borges-Medeiros¹, Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer¹, Ana Cláudia dos Anjos², Aderson S Araujo², Antonio R Lucena-Araujo¹, Marcos A C Bezerra¹.

Affiliations:

¹Graduate Program in Genetics, Bioscience Centre, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

²Department of Internal Medicine, Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil;

Corresponding author:

Marcos André Cavalcanti Bezerra

Graduate Program In Genetics, Bioscience Centre, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE, 50610-901, Brazil

E-mail: macbezerraufpe@gmail.com

Running title: *KLOTHO* modulates clinical complications in sickle cell anaemia

Summary

Sickle cell anaemia (SCA) is one of the most common monogenic diseases worldwide and is characterized for presenting large phenotypic heterogeneity, which is influenced by environmental and genetic factors. Among the candidate genetic factors, *KLOTHO* becomes interesting because it is involved in important pathways in the pathophysiology of the disease, as in the expression of adhesion molecules, oxidative stress and nitric oxide biology. We evaluated two polymorphisms in *KL* (rs685417 (G>A) and rs211239 (A>G)) in a sample of 703 unrelated patients with SCA divided into case and control groups. Additionally, we examined the levels of gene expression in the different groups. Our results demonstrated an association between the polymorphism rs68417 (G>A) showed an association with painful crisis ($p=0.006$), number of complications ($p=0.029$), frequency of cerebrovascular disease ($p=0.017$) and time to develop cerebrovascular disease ($p=0.004$). The SNP rs211239 (A>G) and the levels of gene expression, in turn, was not associated with any clinical complications. Our data suggest that *KL* may be important in pathophysiology of SCA and can be an important prognostic indicator.

Keywords: heterogeneity, rs685417, rs211239, prognostic indicator, expression.

Introduction

Sickle cell anaemia (SCA) (condition resulting from an inheritance in the homozygous gene encoding haemoglobin S) is the most common monogenic disease in the world and is a public health problem in Brazil (Sommer *et al*, 2006; Simões *et al*, 2010). The main clinical complications presented by patients are painful crisis, osteoarticular complications (e.g. osteonecrosis), leg ulcers, cerebrovascular disease, acute chest syndrome and priapism (Ballas *et al*, 2010; Steinberg, 2005). The clinical course of patients, however, is marked by intense phenotypic heterogeneity due to environmental and genetic factors (Sebastiani *et al*, 2010).

In this context, polymorphisms in genes linked to pathways related to vascular homeostasis started to be studied, in order to find association with the modulation of disease (Steinberg, 2009). Among them, the *KLOTHO* (*KL*) gene, discovered in 1997 by Kuro-o *et al*, emerges as a potential candidate for SCA modulation, as several studies showed that it is involved in the expression of adhesion molecules, oxidative stress and nitric oxide biology (Saito *et al*, 1998; Maekawa *et al*, 2009; Yamamoto *et al*, 2005; Richter *et al*, 2016). In this way, we hypothesize that polymorphisms in this

gene can alter the expression and function of the gene and thereby modulate the clinical course of the disease.

Methods

Patients

This study was conducted in a cohort of 703 patients with SCA (median age 26, range: 4 to 62), diagnosed and followed at Haematology and Haemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE), Recife, Brazil. SCA was diagnosed for each patient on the basis of haemoglobin electrophoresis and family study. The quantification of haemoglobins F and A (HbF and HbA) was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using Bio-Rad Variant II HPLC system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Additionally, clinical and laboratorial data were obtained from the patients' medical records and they were divided into case and control groups.

Selection of cases and controls

The patients were divided into subgroups case according to their clinical complication. The complications analysed were: leg ulcers, osteonecrosis, cerebrovascular disease (CVD), acute chest syndrome (ACS) and priapism. Its occurrences were determined by clinical reports in the medical records and imaging tests when applicable, such as x-ray, magnetic resonance imaging and transcranial doppler.

Cases were defined in the following ways: patients with an ulceration of the skin of the lower legs, especially the medial or lateral surfaces, which failed to heal within a period of two weeks, were cases for leg ulcers (Minniti *et al*, 2010). Regarding osteonecrosis, cases were patients with radiologically documented necrosis of the hip or shoulder (Ballas *et al*, 2010). Cerebrovascular disease cases were patients with neurological injury proven by imaging and apparent complaints and manifestations resulting from stroke and patients presenting risk to develop stroke determined by high velocities in transcranial doppler ultrasonography; were excluded patients with comorbidities that could generate confounding with this complication, like seizures (Domingos *et al*, 2014; Adams *et al*, 1998). Cases for ACS were patients with a pulmonary infiltrate on chest x-ray (Vichinsky *et al*, 2000, 1997). Finally, priapism cases were male patients who had at least one episode of a painful erection of the penis that

lasted more than one hour and was severe enough for the patient to seek medical care (Burnett *et al*, 2015; Vicari & Figueiredo, 2007).

We also categorized patients by painful crisis (less than 3, between 3 and 6 and more than 6), number of complications and time to development of complications.

The control group was composed by sickle cell anaemia patients, over 18-year-old, with normal means of transcranial doppler velocities, without hypertension and pulmonary arterial hypertension, without clinical suspect or presence of dactylitis, acute chest syndrome (ACS), leg ulcer, osteonecrosis, cerebrovascular disease (CVD) and priapism. However, it was not possible to include in this control group, patients without painful crisis due to high prevalence of this complication in our population, so the association analyses were performed comparing the number of painful events among patients (Belini *et al*, 2015).

Laboratory data

Full blood counts were done on a Coulter STKS (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Classical parameters were measured, such as red blood cell (RBC) counts, Hb, and reticulocyte counts. Routine biochemical parameters were measured using a Roche Cobas Mira Plus Chemistry Analyzer (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping

For genetic analysis, peripheral blood samples were collected from all patients and genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method (Davis *et al*. 1986) and RNA was extracted using the method of Chomczynski e Sacchi after the approval by the local Research Ethics Board (035/2010). The intronic polymorphisms *KL* rs211239 (A>G) and rs685417 (G>A) were selected using the SNPbrowser software version 4.0. The criteria for selection were that the polymorphisms should be TagSNPs and to have the minor allele frequency (MAF) of over 10% in Caucasian and African populations, which contributed to the ethnic background of Brazilian population. The SNP rs211239 (A>G) was genotyped using the PCR method followed by restriction fragment analysis (MspI enzyme) and rs685417 (G>A) was genotyped by real-time PCR using TaqMan system. The complete assay is found on the link <https://products.appliedbiosystems.com> – ID: C___2983081_10.

Gene expression

In order to analyse whether *KL* expression was altered by the presence of polymorphisms and in clinical complications, we performed gene expression assays.

The experiments were carried out as follows: following total RNA extraction, real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) assays with sample-derived cDNA were performed in duplicate on Microamp optical 96-well plates using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the *GAPDH* as endogenous control. The expression levels of *KL* were quantified using TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), following the manufacturer's instructions.

The comparative Ct method was used to determine the relative expression level of *KL*. The difference in Ct number ($\Delta Ct = Ct_{KL} - Ct_{GAPDH}$) was calculated for each replicate. Without detectable gene amplification within 40 cycles, the respective gene expression values were set at 0. The gene expression of *KL* was calculated relative to a reference cDNA (pool of 35 patients with normal haemoglobin profile - HbAA). The gene expression values of *KL* were calculated as relative quantification (RQ) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{SCDpatients} - \Delta Ct_{PoolHbAA}$.

Statistical analyses

Patient baseline characteristics were reported descriptively. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 19,0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA), with the level of significance set to 5%. Fisher's exact test and the χ^2 test were employed for genotype and allele frequency comparisons. The risk was defined in terms of odds ratio (OR) with confidence interval (CI), with significance levels up to 95%. Cumulative incidence curves were constructed reflecting the time for complications development, Gray's test was used to compare the curves (Kim, 2007).

Results

Characterization of patients

We analysed 703 medical records of patients with SCA and we found 350 (49.8%) patients who develop at least one of the following complications: osteonecrosis, priapism, cerebrovascular disease, acute chest syndrome and leg ulcer. Among them, 123 (17.5%) patients developed CVD; 84 (11.9%) had osteonecrosis; 140 (19.9%) had leg ulcers; 95 of the men (27.6%) presented priapism

and 91 (13%) had ACS. There were 123 patients (17.5%) characterized as control group. In table 1, it is possible to see the clinical characteristics of the group studied.

Table 1: Patients' characteristics with distribution of different complications in sickle cell anaemia

<i>Patients characteristics (n=703)</i>	N or mean	(% or range)
Gender ratio: Female/Male	359/344	(51/49)
Age, years	26	(4-62)
Complications:		
Painful crisis		
<3x/year	379	(54)
>3x/year	270	(38.4)
>6x/year	54	(7,6)
Cerebrovascular disease	123	(17,5)
Osteonecrosis	84	(11.9)
Leg ulcers	140	(19.9)
Priapism	95	(27.6*)
ACS	91	(13)
Number of complications		
0	353	(50.2)
1	247	(35.1)
2 or more	103	(14.7)
Control	123	(17.5)
Age, years	28	(18 – 53)

***Considering only male patients**

Genetic association studies

We analyzed the dominant, co-dominant, recessive and over dominant association models for both polymorphisms. For the SNP rs211239 (A>G) we genotyped 698 patients and we did not found any association with the clinical complications studied. On the other hand, for polymorphism rs685417 (G>A) we genotyped 666 patients and, using the dominant model, we found association with number of painful crisis ($p=0.006$), number of complications ($p=0.029$), and frequency of CDV ($p=0.017$) (Table 2).

Table 2: Dominant genetic inheritance model of polymorphism rs685417 (G>A).

<i>rs685417 (G>A)</i>	GG		GA + AA		p-value	OR (CI 95%)
	N	%	N	%		
Painful crisis					$p=0.006^*$	
<3/year	49	13.8	306	86.2		
>3/year	50	19.3	209	80.7		

The polymorphism rs685417 (G>A) impact on CDV development time was evaluated. The cumulative incidence of these complication was significantly lower for patients with genotype GG (Figure 1).

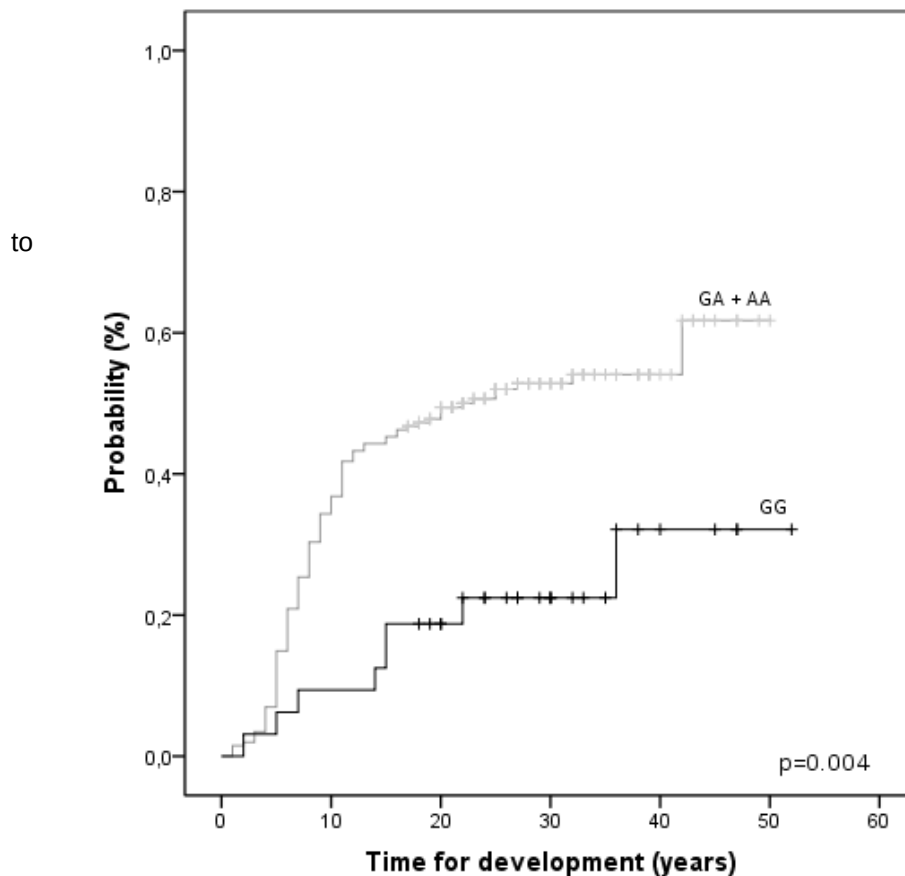


Figure 1:
Cumulative
incidence of
cerebrovascular
disease according
genotype.

**Gene
expression**

Seventy-four SCA patients (mean age 27 years old, 18 – 40; 41 women and 33 men) and thirty-five healthy subjects without SCA (mean age 24 years old, 20 – 37; 23 women and 12 men) were enrolled.

We evaluated the expression levels of SCA patients compared to the genotypes of the polymorphisms and towards the clinical complications, but no association was found. When analyzing the levels of expression between the subjects with and without SCA, it was observed that in SCA levels of expression were decreased ($p=0.0001$) (Figure II).

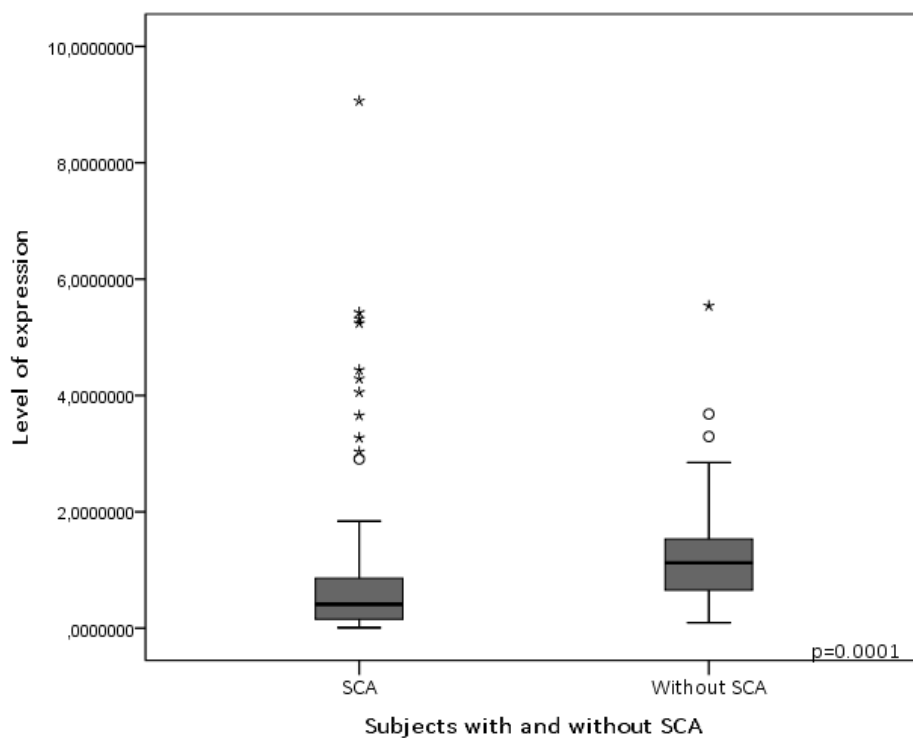


Figure 2: Levels of expression in patients with and without SCA.

Discussion

Although sickle cell anaemia is a monogenic disease, it is marked by intense phenotypic heterogeneity (Steinberg, 2009; Fertrin & Costa, 2010). In this way, genes involved in pathways important in their pathophysiology are studied, in order to evaluate their possible contribution in the clinical modulation of the disease (Steinberg, 2009; Fertrin & Costa, 2010). Among them, we have the gene *KLOTHO*, which is involved in the pathophysiology that is involved in the biology of nitric oxide, expression of adhesion molecules and combat oxidative stress (Yamamoto *et al*, 2005; Maekawa *et al*, 2009; Saito *et al*, 1998). Thus, we studied polymorphisms rs211239 (A> G) and rs685417 (G> A), as well as expression levels of *KLOTHO* mRNA in peripheral blood to evaluate possible associations with the major clinical complications of sickle cell anaemia.

When analysing the rs211239 (A>G) polymorphism we found no association with any of the clinical complications studied, other than the work of Baldwin *et al* (2005) and Nolan *et al* (2004) which found association of this polymorphism with a higher frequency of osteonecrosis and priapism, respectively (Baldwin *et al*, 2005; Nolan *et al*, 2004). The lack of reproducibility may be due to the different population sample studied, since both groups studied American subjects while we used Brazilian

subjects. In addition, we use different criteria for categorizing in the division of cases and controls groups. Similar to our results, the work of Elliot *et al* (2007) and Ulug *et al* (2009) found no association of this polymorphism with priapism and osteonecrosis, respectively (Elliott *et al*, 2007; Ulug *et al*, 2009).

Regarding the polymorphism rs685417, we have shown an association with a higher frequency vessel occlusive crises, more complications, more frequent cerebrovascular disease and the development of CVD time. The other studies that evaluated this polymorphism in sickle cell anaemia were those of Baldwin *et al* (2005), Nolan *et al* (2006) who found association with osteonecrosis and leg ulcers respectively, and Souza *et al* (2015) who did not reproduce the findings of Nolan *et al*. The differences between our results, as explained for polymorphism rs211239, may be due to the criteria adopted in the division of groups and also by the genetic composition of the studied population (Baldwin *et al*, 2005; Nolan *et al*, 2006; Souza *et al*, 2015).

Since *KL* plays a major role in vascular homeostasis, factors that alter the function of its product can lead to failures in the biological mechanisms in which it participates (Pacheco and Moraes 2009). Because it is involved in NO metabolism, if its protein function fails, the vasodilator performance can be greatly compromised and, in addition to the depletion that already occurs due to the intense haemolysis suffered by patients with SCA), increase the frequency of complications (Nolan *et al*, 2006; Elliott *et al*, 2007). Moreover, by suppressing adhesion molecules, its compromise leads to increased vascular adhesion (Maekawa *et al*, 2009), which may be the explanation for the greater number of painful crisis in patients with the genotypes GA and AA. Such impairment, which can lead to endothelial dysfunction (Mencke & Hillebrands, 2016; Richter *et al*, 2016), may also be responsible for the fact that individuals GA and AA have a higher frequency of CVD, in addition to presenting them earlier than Individuals with wild genotype (GG), since this clinical complication has its pathophysiological process influenced by both NO depletion and increased vascular compliance. Therefore, our data support the hypothesis that the heterozygote and homozygous variant genotypes (GA and AA) of rs685417 polymorphism may compromise the function of the gene product and possible explain the associations found.

Regarding *KL* expression levels, we did not find differences between the different genotypes of the polymorphisms or between the clinical complications. On the

other hand, we found a difference between individuals with and without sickle cell anaemia, which may be due to the fact that the chronic inflammatory process present in the individuals with SCA decreases the expression of this gene (Thurston *et al*, 2010). Although the association between the polymorphism rs685417 (G>A) and number of painful crisis, number of complications and CVD, has not been correlated with gene mRNA expression levels (such as clinical complications per se), analysis on protein levels could elucidate how the *KL* gene may be modulating the clinical practice of SCA patients, as it may be that the interference of the polymorphism in the gene product occurs in a post-transcriptional step.

In summary, our work showed unprecedented associations regarding *KL* and the clinical practice of SCA. These results require validation to determine the true relevance of *KL* polymorphism in clinical features of SCA and if they serve as a further prognostic indication in their clinical follow-up.

Acknowledgements

The authors thank to the sickle cell anaemia patients and their families who made this research possible.

References

- Adams, R.J., McKie, V.C., Hsu, L., Files, B., Vichinsky, E., Pegelow, C., Abboud, M., Gallagher, D., Kutlar, A., Nichols, F.T., Bonds, D.R. & Brambilla, D. (1998) Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler. *The New England Journal of Medicine*, **339**, 5–11.
- Baldwin, C., Nolan, V.G., Wyszynski, D.F., Ma, Q., Sebastiani, P., Embury, S.H., Bisbee, A., Farrell, J., Farrer, L. & Steinberg, M.H. (2005) Association of klotho , bone morphogenic protein 6 , and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood*, **106**, 372–376.
- Ballas, S.K., Lieff, S., Benjamin, L.J., Dampier, C.D., Heeney, M.M., Hoppe, C., Johnson, C.S., Rogers, Z.R., Smith-whitley, K. & Wang, W.C. (2010) Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, **85**, 6–13.
- Belini, E., Grünig, D., Silva, H., Souza, L. De, Viviani, J., Lopes, C., Lobo, D.C. & Bonini-domingos, C.R. (2015) Severity of Brazilian sickle cell disease patients : Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **54**, 321–327 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.011>.
- Burnett, A.L., Anele, U.A., IN, T. & Al, E. (2015) Prevention of Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease: Sildenafil: Commentary on: Randomized Controlled Trial of Sildenafil for Preventing Recurrent Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease. *Urology*, **86**, 1055–1056 Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2015.07.003>.
- Domingos, I.F., Falcão, D.A., Hatzlhofer, B.L., Cunha, A.F., Santos, M.N., Albuquerque, D.M., Fertrin, K.Y., Costa, F.F., Azevedo, R.C., Machado, C.G., Araújo, A.S., Lucena-Araújo, A.R. & Bezerra, M.A. (2014) Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol*, **93**, 1123–1129.
- Elliott, L., Ashley-koch, A.E., Castro, L. De, Jonassaint, J., Price, J., Ataga, K.I., Levesque, C., Weinberg, J.B., Eckman, R., Orringer, E.P., Vance, M. & Telen, M.J. (2007) Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *British journal of haematology*, **137**, 262–267.
- Fertrin, K.Y. & Costa, F.F. (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease : implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol*, **3**, 443–458.
- Kim, H.T. (2007) Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. *Clinical Cancer Research*, **13**, 559–565.
- Maekawa, Y., Ishikawa, K., Yasuda, O., Oguro, R., Hanasaki, H., Katsuya, T. & Rakugi, H. (2009) Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocr*, **35**, 341–346.
- Mencke, R. & Hillebrands, J.-L. (2016) The Role of the Anti-Ageing Protein Klotho in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Ageing research reviews* Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.001>.
- Minniti, C.P., Eckman, J., Sebastiani, P., Steinberg, M.H. & Ballas, S.K. (2010) Leg ulcers in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, **85**, 831–833.
- Nolan, V.G., Adewoye, A., Baldwin, C., Wang, L., Ma, Q., Diego, F., Farrell, J.J., Sebastiani, P. & Steinberg, M.H. (2006) Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *British journal of haematology*, **133**, 570–578.
- Nolan, V.G., Baldwin, C., Ma, Q., Wyszynski, D.F., Farrell, J.J., Bisbee, A., Embury, S.H., Farrer, L.A. & Steinberg, M.H. (2004) Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *British journal of haematology*, **128**, 266–272.
- Richter, B., Haller, J., Haffner, D. & Leifheit-nestler, M. (2016) Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *European Journal of Physiology*, **468**, 1621–1635 Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1858-x>.
- Saito, Y., Yamagishi, T., Nakamura, T., Ohyama, Y., Aizawa, H., Suga, T., Matsumura, Y., Masuda, H., Kurabayashi, M., Kuro-o, M., Nabeshima, Y. & Nagai, R. (1998) Klotho Protein Protects against Endothelial Dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **248**, 324–329.
- Sebastiani, P., Solovieff, N., Hartley, S.W., Milton, J.N., Dworkis, D.A., Melista, E., Klings, E.S., Garrett, M.E., Telen, M.J., Ashley-koch, A., Baldwin, C.T. & Steinberg, M.H. (2010) Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *American Journal of Hematology*, **85**, 29–35.
- Simões, B.P., Pieroni, F., Barros, G.M.N., Machado, C.L., Cançado, R.D., Salvino, M.A., Angulo, I. & Voltarelli, J.C. (2010) Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **32**, 46–53 Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000700009&lng=pt&nrm=iso&tling=pt [Accessed November 21, 2014].

- Sommer, C.K., Goldbeck, A.S., Wagner, S.C. & Castro, S.M. (2006) Triagem neonatal para hemoglobinopatias : experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul , Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, **22**, 1709–1714.
- Souza, C.R.L., Shimmoto, M.M.A., Vicari, P., Mecabo, G., Arruda, M.M. & Figueiredo, M.S. (2015) Klotho gene polymorphisms and their association with sickle cell disease phenotypes. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **37**, 275–276 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.02.009>.
- Steinberg, M.H. (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *British journal of haematology*, **129**, 465–481.
- Steinberg, M.H. (2009) Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. , 46–67.
- Thurston, R.D., Larmonier, C.B., Majewski, P.M., Ramalingam, R., Midura-Kiela, M., Laubitz, D., Vandewalle, A., Besselsen, D.G., Muhlbauer, M., Jobin, C., Kiela, P.R. & Ghishan, F.K. (2010) Downregulation of aging-related Klotho gene in experimental colitis: the role of TNF and IFN- γ . *Gastroenterology*, **138**, 1384–1394.
- Ulug, P., Vasavda, N., Awogbade, M., Cunningham, J., Menzel, S. & Thein, S.L. (2009) Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. *Ann Hematol*, **88**, 803–805.
- Vicari, P. & Figueiredo, M.S. (2007) Priapismo na doença falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **29**, 275–278.
- Vichinsky, E.P., Neumayr, L.D., Earles, A.N., Williams, R., Lennette, E.T., Dean, D., Nickerson, B., Orringer, E., McKie, V., Bellevue, R., Daeschner, C. & Manci, E.A. (2000) Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *The New England Journal of Medicine*, **342**, 1855–1865.
- Vichinsky, E.P., Styles, L.A., Colangelo, L.H., Wright, E.C., Castro, O. & Nickerson, B. (1997) Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. *Blood*, **89**, 1787–1792.
- Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J. V, Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Miyoshi, M., Ogawa, Y., Castrillon, D.H., Rosenblatt, K.P. & Kuro-o, M. (2005) Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. *J Biol Chem*, **280**, 38029–38034.

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista

Curriculum Vitae

Janeiro/2017

Dados pessoais

Nome Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista

Filiação Eugênio Pereira Batista e Leodegária Gadelha de Freitas Batista

Nascimento 15/01/1991 - Natal/RN - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2015** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Avaliação do impacto de polimorfismos e da expressão do gene *KLOTHO* nas complicações clínicas da anemia falciforme
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra
Co-orientador: Antônio Roberto Lucena de Araújo
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2010 - 2014** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
Título: Aloimunização em pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte
Orientador: Christiane Medeiros Bezerra

Formação complementar

- 2013** Curso de curta duração em Hematologia Laboratorial. (Carga horária: 125h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). (Carga horária: 6h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em I Curso de Atualização em Medicina

- Laboratorial. (Carga horária: 12h).
Centro Avançado de Oncologia, CECAN, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Genoma, Proteoma e Universo Celular - Hemocentro. (Carga horária: 42h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Citometria de Fluxo na Pesquisa Biomédica. (Carga horária: 42h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2013 - 2013** IV Curso de Atualização em Hematologia Laboratorial. . (Carga horária: 125h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Bases da Citologia Clínica. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdades Integradas de Patos - FIP

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Monitora - Imunohematologia , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitora do módulo de imunohematologia.

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Integral

3. Hospital Giselda Trigueiro - HGT

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiária em Análises Clínicas , Carga horária: 540, Regime: Integral

4. Centro Integrado de Microbiologia - CIM

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estágio em Microbiologia , Carga horária: 540, Regime: Integral

5. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Vínculo institucional

2013 - 2014 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitora - Fundamentos de Hematologia, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

2015 - Atual Avaliação do impacto de polimorfismos e da expressão do gene *KLOTHO* nas complicações clínicas da anemia falciforme

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista (Responsável); ; Marcos André Cavalcanti Bezerra; Antonio Roberto Lucena de Araujo; Diego Antonio Pereira Martins; Aderson da Silva Araujo

2014 - 2014 Fatores associados à variabilidade clínica de pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista (Responsável); ; Christiane Medeiros Bezerra; Jayra Juliana Paiva Alves; Thales Alyrio de Araújo Medeiros Fernandes

2011 - 2012 Avaliação farmacológica e biotecnológica de moléculas obtidas de plantas de diferentes biomas do estado do Rio Grande do Norte

Descrição: Foram obtidos diferentes extratos da folha da acerola (*Malpighia glabra*). Tais extratos, com concentrações conhecidas, foram testados quanto a sua atividade antioxidante e antiproliferativa.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista; Katia Castanho Scortecchi (Responsável); Hugo Alexandre de Oliveira Rocha; Ana Karina de Lima Nascimento;

Ingrid Gurgel Saraiva Maia; Nayana Luiza Soares de Araújo

Projeto de extensão

2013 - 2014 Educação em saúde no pré-natal: Construindo caminhos para a qualificação da assistência às gestantes do bairro Planalto

Descrição: O projeto visa levar às gestantes do bairro do Planalto, Natal/RN, a oportunidade de comparecer a palestras de estudantes das diversas áreas da saúde a fim de tirar dúvidas e aprender um pouco mais sobre como ter uma gestação saudável. Há também coleta de amostras para realização de exames (hemograma, VDRL, dosagem de glicose, classificação sanguínea) no Laboratório Escola de Biomedicina da UFRN.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista; Tamyres Bernadete Dantas Queiroga; Christiane Medeiros Bezerra (Responsável); Rosângela Lima De F Nobre; Renato Motta Neto; Valdemira Izidro M. Almeida; Francisca Nazare Liberalino; Tereza Maria Dantas De Medeiros; Dayse Santos Arimateia; Monique Gabriela Das Chagas Faustino Alves; Fabricio Melo Dos Santos; Jayra Juliana Paiva Alves; Mackson Luiz Fernandes Da Costa; Ana Cecília Carlos Dantas; Camila Ataíde Rebouças; Richardson Rafael Santos De Oliveira; Jéssica Juliana Nogueira De Queiroz; Alexia Tayane Menezes De Melo; Ana Márcia Azevedo De Sousa; Larissa Pires De Moura; Ingryd Camara Moraes; Marcia Camila Dantas Rego

2012 - 2012 BiomedCINE: uso de filmes na abordagem interdisciplinar da saúde humana, bioética, pesquisa biomédica e cidadania.

Descrição: Foi realizada exibição mensal de filmes com temáticas ligadas às ciências da saúde e biológicas, tal como à bioética. Após cada exibição havia debate entre um especialista na área abordada no filme em questão e os demais espectadores presentes.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista; Carlos Augusto Galvao Barbosa (Responsável); Ermeton Duarte do Nascimento; Luíza Araújo da Costa Xavier; Naisandra Bezerra da Silva; Allan Roberto Dias Nunes; Pedro Bruno Fernandes; Carolina Araujo Sousa; Phiética Raíssa Rodrigues da Silva; Tamyres Bernadete Dantas Queiroga; Vanessa Milena Alves de Sousa; Jéssica de Andrade Pessoa; Thiago André Cidral; Isabela Andrade Dantas de Araújo; Maria Eduarda de

Souza Menezes da Costa

2011 - 2011 BiomedCINE 2011

Descrição: O projeto propôs a criação de espaços onde discentes e docentes da UFRN estabeleceram um diálogo variado, multidisciplinar, fora dos moldes e limitações impostos pela teoria, propiciando um novo olhar sobre a saúde, a bioética, a pesquisa biomédica e a formação de profissionais com forte sentimento de cidadania. Foram exibidos, mensalmente, filmes comerciais e após a exibição de cada filme e havia estimulação de debate sobre a temática abordada na exibição.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista; Carlos Augusto Galvao Barbosa (Responsável); Ermeton Duarte do Nascimento; Allan Roberto Dias Nunes; Pedro Bruno Fernandes; Phiética Raíssa Rodrigues da Silva; Isabela Andrade Dantas de Araújo; Gabriela de Faria Oliveira; Viviane Souza do Amaral; Claudio Marcos Teixeira de Queiroz; Elizeu Antunes dos Santos; Elaine Cristina Gavioli

2011 - 2011 Comemoração do Dia do Biomédico

Descrição: A fim de divulgar a profissão da Biomedicina para a população de Natal/RN, foi organizado um evento no Shopping Via Direta, no qual foi montada estrutura para mostrar aos transeuntes o que é a Biomedicina e como o profissional pode atuar. Foi feito uso de banners e também exposição de algumas análises laboratoriais e de pesquisa que cabem ao profissional.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista; Carlos Augusto Galvao Barbosa; Ermeton Duarte do Nascimento (Responsável); Allan Roberto Dias Nunes; Pedro Bruno Fernandes; Phiética Raíssa Rodrigues da Silva; Isabela Andrade Dantas de Araújo

Áreas de atuação

1. Hematologia
2. Bioquímica

Produção

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. **BATISTA, J. V. G. F.**; MARTINS, D. A. P.; PRADO, L. P. L.; BATISTA, T. H. C.; ARCANJO, G. S.; PERES, J. C.; CALLADO, F. M. R. A.; Fernandes, T A A M; ARAUJO, A. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C.

Avaliação do impacto do polimorfismo rs685417 e da expressão do gene KLOTHO nas complicações clínicas da anemia falciforme, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. HATZLHOFFER, B. L. D.; MARTINS, D. A. P.; FALCÃO, D. A.; MEDEIROS, R. L. B.; **BATISTA, J. V. G. F.**; Souza M.B; ARAUJO, A. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C.

Influência dos haplótipos Bs e da talassemia alfa no perfil clínico da anemia falciforme em Pernambuco, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. **BATISTA, J. V. G. F.**; ALBUQUERQUE, F.; BATISTA, T. C.; ARCANJO, G. S.; BEZERRA, M. A. C.

Investigação de polimorfismos no gene KLOTHO nas manifestações clínicas de pacientes com anemia falciforme, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. **BATISTA, J. V. G. F.**; MARTINS, D. A. P.; FALCÃO, D. A.; DOMINGOS, I. F.; CALLADO, F. M. R. A.; Peres, J. C.; ARAUJO, A. S.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C.

Klotho gene polymorphisms and their association with clinical manifestations in patients with sickle cell anemia, 2016. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. **BATISTA, J. V. G. F.**; Fernandes, T A A M; MEDEIROS, T. M. D.; BEZERRA, C. M.

Aloimunização em pacientes com doenças falciformes provenientes do estado do Rio Grande do Norte, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. **BATISTA, J. V. G. F.**; MARTINS, D. A. P.; DOMINGOS, I. F.; FALCÃO, D. A.; HATZLHOFFER, B. L. D.; ARAUJO, A. S.; ANJOS, A. C.; CALLADO, F. M. R. A.; ARAUJO, A. R. L.; BEZERRA, M. A. C.

Associação de polimorfismos genéticos em KLOTHO com o desenvolvimento de priapismo em pacientes com anemia falciforme, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2016**, 2016. (Congresso)
Influência do haplótipo Bs e da talassemia alfa no perfil clínico da anemia falciforme em Pernambuco, Brasil.
2. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2016**, 2016. (Congresso)
Klotho gene polymorphisms and their association with clinical manifestations in patients with sickle cell anemia.
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro de Genética do Nordeste - ENGENE**, 2016. (Congresso)
Avaliação do impacto do polimorfismo rs685417 e da expressão do gene KLOTHO nas complicações clínicas da anemia falciforme.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2015. (Congresso)
ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM KLOTHO COM O DESENVOLVIMENTO DE PRIAPISMO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.
5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular**, 2015. (Congresso)
ALOIMUNIZAÇÃO EM PACIENTES COM DOENÇAS FALCIFORMES PROVENIENTES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE.
6. **V Jornada da pós graduação em genética da UFPE**, 2015. (Outra)

Organização de evento

1. **BATISTA, J. V. G. F.**; MEDEIROS, R. L. B.; Souza M.B; FALCÃO, D. A.; DOMINGOS, I. F.; BEZERRA, M. A. C.
I Curso de Flebotomia, 2016. (Outro, Organização de evento)
2. **BATISTA, J. V. G. F.**
IV Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2015. (Outro, Organização de evento)
3. **BATISTA, J. V. G. F.**
V Curso de Flebotomia e Técnicas Hematológicas, 2015. (Outro, Organização de evento)
4. **BATISTA, J. V. G. F.**; BEZERRA, M. A. C.; MEDEIROS, R. L. B.; CIRINO, I. C. S.;

SANTOS, N.

V Jornada da Pós Graduação em Genética da UFPE, 2015. (Outro, Organização de evento)