

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

JESSICA MARIA FLORENCIO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE *THBS1* NAS
COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

Recife
2019

JESSICA MARIA FLORENCIO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE *THBS1* NAS
COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

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

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Oliveira, Jéssica Maria Florêncio

Avaliação da influência de polimorfismos do gene THBS1 nas complicações clínicas da anemia falciforme / Jéssica Maria Florêncio Oliveira- 2019.

76 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2019.

Inclui referências e anexo

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

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-190

JESSICA MARIA FLORENCIO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE *THBS1* NAS
COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

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

Aprovada em 28 /02 /2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael Lima Guimarães
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

A minha eterna amiga, anjo da guarda e mãe Maria Aparecida (In memoriam), por ter me mostrado que o conhecimento é o bem mais valioso.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela capacitação proporcionada ao longo da minha vida acadêmica, mostrando que eu posso ir além.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial aos professores do programa de pós-graduação em genética, pelos ensinamentos que me foram transmitidos.

À Fundação HEMOPE pela parceria e colaboração no acompanhamento dos pacientes.

A todos os pacientes que concordaram em participar deste trabalho.

À Facepe e ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Marcos André e Prof. Dr. Antônio Roberto, pelas oportunidades oferecidas, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado e, acima de tudo, pela amizade. Obrigada pela confiança.

Ao pessoal que integra o NHCL, pelas contribuições e por ter me recebido tão bem.

À banca examinadora, pela gentileza e disponibilidade concedida a este trabalho.

Aos amigos do mestrado, pelas trocas de conhecimentos e vivências nas horas intermináveis de estudo. Aquela amizade construída por uma disciplina chamada BioMol.

Às amigas Jessica Vitória, Aleide Melo, Marianny Pacheco e Flávia Albuquerque, por todos os momentos felizes compartilhados. Amigas que Recife me deu e que quero levar para o resto da vida.

À minha família, sinônimo de amor e união. Aos meus pais pela educação ensinada e pela indicação dos bons caminhos. E aos meus irmãos pela verdadeira amizade que cultivamos, somos um só coração.

A Rafael, por toda compreensão, amor, companheirismo e colaboração. Agradeço seu incentivo, ao seu modo, sempre.

Às minhas companheiras de moradia em Recife (Denise, Mary, Hellen e Kaká), pelas boas risadas e ombro amigo nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária monogênica, caracterizada por grande variabilidade clínica. Apesar de evidências mostrarem que fatores genéticos podem estar envolvidos na modulação fenotípica da doença, estes não estão bem estabelecidos. Neste sentido, o gene *THBS1* é visto como alvo molecular promissor devido seu papel na adesão celular e biologia do óxido nítrico, que são processos importantes na fisiopatologia da AF. O objetivo do estudo foi avaliar se os polimorfismos rs17633107 (A>C) e rs1478605 (A>G) no gene *THBS1* estão relacionados com complicações clínicas da AF. A genotipagem dos SNPs foi realizada utilizando sondas TaqMan por PCR em tempo real. O estudo foi conduzido por comparação de grupos (casos e controles), sendo realizada a caracterização clínica e molecular em 965 pacientes, que, de acordo com a ocorrência das complicações clínicas por faixa etária, foram classificados em três grupos (I, II e III). Os resultados demonstraram que nenhuma associação foi observada entre a presença do SNP rs17633107 e as complicações clínicas avaliadas. Em contrapartida, os pacientes com o genótipo variante GG para o SNP rs1478605 apresentaram menor frequência de desenvolver AVC quando comparados aos indivíduos com genótipos AG e AA ($p=0,011$; OR=0,30; IC-95%=0.11-0,78). O alelo A do SNP rs1478605 demonstrou associação como fator de risco para a ocorrência de AVC. Dessa forma, podemos perceber que possivelmente os genótipos AG e AA para o polimorfismo rs1478605 podem indicar um pior prognóstico ao paciente, embora sejam necessários estudos funcionais que possam elucidar melhor essa contribuição fenotípica.

Palavras-chave: Anemia falciforme. rs1478605. rs17633107. Moduladores genéticos.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a monogenic hereditary disease, characterized by high clinical variability. Despite evidence shows that genetic factors may be involved in phenotypic modulation of the disease, they are not well established. In this context, the *THBS1* gene is seen as promising molecular target due to its role in cellular adhesion and biology of nitric oxide, which are important processes in the pathophysiology of AF. The objective of this study was evaluated whether polymorphisms rs17633107 (A>C) and rs1478605 (A>G) in the *THBS1* gene are related to clinical complications of SCA. Polymorphism genotyping was done using TaqMan assay in real-time PCR process. The study was conducted by performing a comparison of groups (cases and controls), clinical and molecular characterization was performed in 965 patients, who, according to the occurrence of clinical complications by age group, were classified into three groups (I, II and III). The results showed no association was observed between the presence of the SNP rs17633107 and clinical complications evaluated. In contrast, patients with the GG variant genotype for the rs1478605 SNP had a lower frequency of developing stroke when compared to individuals with AG and AA genotypes ($p=0,011$; OR=0.30; IC-95%=0.11-0,78). The allele A of the SNP rs 1478605 demonstrated association as a risk factor for the occurrence of stroke. Thus, we have seen that it is possible that the genotypes AG and AA for polymorphism rs1478605 may indicate a worse prognosis to the patient the genotypes AG and AA for polymorphism rs1478605 may indicate a worse prognosis to the patient, although functional studies are needed to better elucidate this phenotypic contribution.

Keywords: Sickle cell anemia. rs1478605. rs17633107. Genetic modulators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Número de recém-nascidos vivos com AF em cada país no ano de 2015.....	17
Figura 2 –	Alteração estrutural da membrana eritrocitária por polímeros de hemoglobina S.....	19
Figura 3 –	Complicações clínicas da doença falciforme.....	21
Figura 4 –	Modificadores genéticos da gravidade fenotípica na doença falciforme.....	27
Figura 5 –	Localização e estrutura do gene THBS1.....	29
Figura 6 –	Representação esquemática da organização estrutural da subunidade monomérica da TSP1.....	29
Figura 7 –	Representação esquemática das principais classes de moléculas que interagem com TSP1.....	30
Figura 8 –	Probabilidade de desenvolvimento de acidente vascular cerebral (AVC) empregando o modelo recessivo de análise genética para o polimorfismo rs1478605 (A>G) nos pacientes com AF classificados no grupo I.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme incluídos no estudo.....	41
Tabela 2 –	Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com AF classificados no grupo I incluídos no estudo.....	42
Tabela 3 –	Caracterização demográfica e clínica dos indivíduos AF classificados no grupo II incluídos no estudo	43
Tabela 4 –	Caracterização demográfica e clínica dos indivíduos AF classificados no grupo III incluídos no estudo.....	44
Tabela 5 –	Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados nos grupos de pacientes com AF incluídos no estudo	45
Tabela 6 –	Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo I incluídos no estudo.....	46

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
A	Adenina
AF	Anemia falciforme
ARB	Árabe-índiano
AST	Aspartato transaminase
AVC	Acidente vascular cerebral
BAN	Bantu
BEN	Benin
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
C	Citosina
CAM	Camarões
CAR	República Centro-Africana
CD36	Cluster de diferenciação 36
CD47	Cluster de diferenciação 47
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CVO	Crise vaso-oclusiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTC	<i>Doppler</i> transcraniano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Do inglês, <i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	Do inglês, <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
G	Guanina
Glu	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A

HbA ₂	Hemoglobina A ₂
<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
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hemope	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	Do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
HU	Hidroxiuréia
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Do inglês, <i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Kb	Kilobases
LDH	Lactato desidrogenase
MAF	Do inglês, <i>minor allele frequency</i>
mL	Mililitro
NO	Do inglês, <i>nitric oxide</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
FS	Fosfatidilserina
Pb	Pares de base
PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
RBC	Do inglês, <i>red blood cells</i>
Rpm	Rotações por minuto
SAU	Saudi-Árabe
SEN	Senegal
SEA	Sequestro Esplênico Agudo
SNP	Do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
T	Timina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Do inglês, <i>transforming growth factor beta</i>
TSP1	Trombospondina 1
TSPs	Trombospondinas

TSR	Repetições de trombospondina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UMI	Úlceras de membros inferiores
Val	Valina
VCAM-1	Do inglês, <i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>
vWC	Do inglês, <i>von Willebrand factor type C</i>
WBC	Do inglês, <i>white blood cells</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	ANEMIA FALCIFORME.....	16
2.1.1	Etiologia e prevalência.....	16
2.1.2	Fisiopatologia.....	17
2.1.3	Complicações clínicas.....	20
2.1.4	Moduladores genéticos da Anemia Falciforme.....	25
2.2	TROMBOSPONDINAS.....	28
2.2.1	Gene THBS1 e Trombospondina 1.....	28
2.2.2	Funções da TSP1.....	30
2.3	TSP1 E POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	36
4.2	DEFINIÇÃO DE GRUPOS.....	36
4.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.4	COLETA DE MATERIAL.....	38
4.5	ANÁLISE LABORATORIAL.....	39
4.6	ANÁLISES MOLECULARES.....	39
4.6.1	Extração do DNA genômico.....	39
4.6.2	Análise molecular dos polimorfismos.....	39
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COM AF.....	41
5.2	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>THBS1</i>	44
6	DISCUSSÃO.....	49
7	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	64
	ANEXO A– PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	68
	CURRICULUM VITAE (LATTES).....	69

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética de caráter autossômico recessivo, com uma ampla distribuição mundial, pertencendo ao grupo das anemias hemolíticas. Esta doença é proveniente de uma mutação pontual no gene que codifica a cadeia β globínica (*HBB*, β^S GAG→GTG; glu6val), resultando na síntese de uma hemoglobina anormal, conhecida como HbS.

A HbS demonstra propriedades bioquímicas peculiares, tendo em vista que a substituição do ácido glutâmico pela valina induz uma alteração mínima na estrutura dessa molécula capaz de provocar, sob condições de baixas concentrações de oxigênio, a sua polimerização e precipitação, alterando assim a forma dos eritrócitos, tornando-os falcizados. Decorrente deste fenômeno de falcização, as hemácias possuem menor sobrevivência e tornam-se mais aderentes ao endotélio, dificultando o fluxo sanguíneo principalmente na microcirculação. Tais fatos, aliados ao processo inflamatório crônico característico da doença, contribuem para os fenômenos vaso-oclusivos e hemolíticos, que são determinantes na origem das complicações clínicas dos pacientes com AF. São elas: crises agudas dolorosas, síndrome torácica aguda (STA), priapismo, osteonecrose, úlceras de membros inferiores (UMI), dactilite, sequestro esplênico (SEA), colelitíase e doença cerebrovascular, que inclui acidente vascular cerebral (AVC) e doppler transcraniano de alto risco.

As complicações clínicas são extremamente diversificadas entre os pacientes, variando de formas quase assintomáticas até clinicamente graves. Além disso, as razões para essa heterogeneidade fenotípica não são completamente entendidas, sendo em parte explicada por dois marcadores genéticos bem caracterizados: os haplótipos β^S e a coexistência com a alfa talassemia. Além destes, diversos estudos sugerem que as complicações clínicas da AF pode ser modulada por polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) presentes em genes candidatos funcionais.

O gene *THBS1*, localizado no cromossomo 15, codifica a trombospondina 1 (TSP1), uma glicoproteína trimérica de 450 kDa membro da família das trombospondinas, caracterizada por diversos sítios de ligação a diferentes receptores de superfície celular e componentes da matriz extracelular, que caracterizam essa proteína como multifuncional. Esse gene é promissor na compreensão do quadro fisiopatológico da AF, devido a TSP1 atuar em vários processos biológicos importantes dessa doença, incluindo inflamação, adesão celular, hemostasia e

biodisponibilidade de óxido nítrico. Ademais, níveis aumentados de TSP1 plasmática já foram evidenciados em pacientes com AF.

Dessa forma, levando em consideração que os pacientes com AF apresentam quadros clínicos variados e que os fatores genéticos que predisõem a tal fato não são bem definidos, polimorfismos genéticos no gene *THBS1* (rs17633107 e rs1478605) podem atuar como possíveis moduladores da heterogeneidade fenotípica observada nesses indivíduos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Etiologia e prevalência

A doença falciforme é um problema de saúde pública mundial e caracteriza-se pela herança genética autossômica recessiva, resultante de alterações na estrutura da hemoglobina associadas ou não à síntese insuficiente das suas cadeias globínicas (WEATHERALL; CLEGG, 2001). Essas hemoglobinopatias podem apresentar as mutações em homozigose para a hemoglobina S ou em heterozigose composta para a hemoglobina S e outras variantes de hemoglobina, tais como a HbC e HbD, bem como as interações com as talassemias. A forma da doença mais comum é a presença da hemoglobina S em homozigose, herdada de ambos os pais (HbSS), definida como anemia falciforme (AZAR; WONG, 2017).

A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica, cuja alteração molecular responsável pelo desenvolvimento dessa doença é devido a uma mutação pontual que ocorre no sexto códon do gene que codifica a cadeia globina β (HBB), localizado no cromossomo 11p15.5. Tal mutação resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica β (HBB; β^S GAG $\rightarrow$ GTG; glu $\rightarrow$ val), levando à formação de uma hemoglobina anormal, conhecida como hemoglobina S, que substitui a hemoglobina normal A (HbA) (DRISS et al., 2009; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

Estudos indicam que a mutação no gene que sintetiza a globina β é oriunda da África e apesar da prevalência ser mais elevada tanto na África subsaariana quanto no Mediterrâneo e na Ásia, os processos migratórios populacionais levaram a disseminação dessa mutação mundialmente (PAGNIER et al., 1984). No Brasil, a mutação foi introduzida pela imigração de escravos durante o período colonial, sendo, portanto, mais prevalente nas regiões onde a proporção de descendentes africanos é maior (ARDUINI; RODRIGUES; TROVÓ DE MARQUI, 2017; LERVOLINO et al., 2011; PIEL et al., 2014).

Estimativas sugerem que anualmente cerca de 300 mil crianças nasçam com AF e que esse número poderia aumentar para 400 mil até 2050 (PIEL et al., 2013). A AF é a doença hereditária monogênica mais comum no mundo (Figura 1), em que 2% da população mundial apresenta a doença (RUSANOVA et al., 2011). Nesse contexto, destaca-se que o Ministério da Saúde no ano de 2001, mediante portaria nº 822,

implementou o diagnóstico precoce de hemoglobinopatias através do Programa Nacional de Triagem Neonatal. De acordo com os dados do Ministério de Saúde, em seu relatório divulgado com dados referentes ao ano de 2013, nascem no Brasil aproximadamente 1.000 recém-nascidos vivos por ano com doença falciforme. No estado de Pernambuco, estima-se o nascimento de uma criança com doença falciforme para cada 1.400 nativos (CANÇADO; JESUS, 2007; WAGNER et al., 2010).

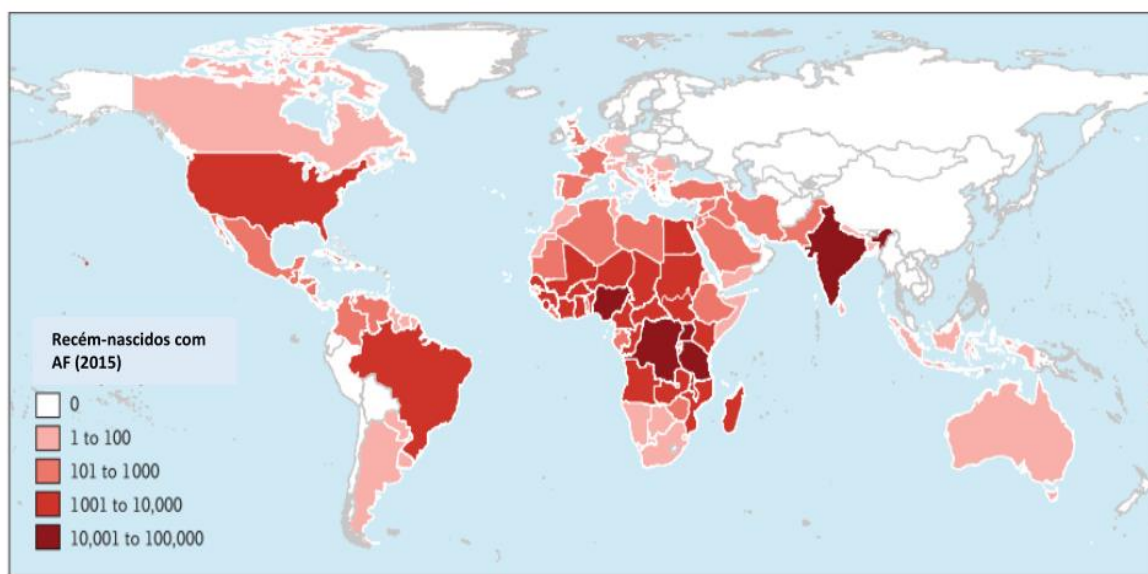


Figura 1- Número de recém-nascidos vivos com AF em cada país no ano de 2015. Adaptado de (Piel et al., 2017).

2.1.2 Fisiopatologia

Com propriedades bioquímicas peculiares, as moléculas de HbS estabelecem interações intermoleculares hidrofóbicas sob baixas condições de oxigênio, que promovem a sua polimerização e precipitação. Isso confere uma série de alterações morfológicas e funcionais aos eritrócitos, tornando-os falcizados (LERVOLINO et al., 2011).

O processo de polimerização é favorecido diretamente pelo resíduo de valina presente na HbS, uma vez que este, sob hipóxia, se liga a uma região hidrofóbica entre um resíduo de fenilalanina e leucina na posição 85 e 88, respectivamente, da cadeia globina β adjacente (AZAR; WONG, 2017). À medida que a desoxi-HbS polimeriza-se, fibras alongadas são sintetizadas e estas se alinham umas com as outras, formando feixes helicoidais que levam à formação do eritrócito falcizado, resultando na redução da deformabilidade celular. Tal fenômeno é reversível quando

há reoxigenação, restaurando a estrutura bicôncava das hemácias. Porém, esses ciclos de polimerização e despolimerização causam danos irreversíveis ao citoesqueleto da membrana do eritrócito falcizado, sendo estas as formas vistas no sangue periférico de pacientes com AF (STEINBERG, 2008; WARE et al., 2017).

Estudos da cinética da polimerização da HbS mostraram que a formação do polímero é uma função exponencial da concentração intra-eritrocitária de HbS desoxigenadas, demonstrando assim o papel crucial da concentração celular dessa hemoglobina no processo de falcização. Além disso, outro condicionante deste fenômeno é a presença da Hb Fetal (HbF) no eritrócito, uma vez que inibe a polimerização e reduz a concentração de HbS (AKINSHEYE et al., 2011; DE FRANCESCHI et al., 2011).

A formação de polímeros HbS dentro das hemácias também altera a permeabilidade da membrana aos íons, prejudicando a homeostase de cátions em algumas células falcizadas. Isto ocorre devido à ativação irregular do sistema de co-transporte K^+Cl^- e do canal de Gardos, que promovem o efluxo no teor de íons celulares seguidos pela água, o que resulta em desidratação celular e maior concentração intracelular de HbS, favorecendo a rápida polimerização (SONATI; COSTA, 2008).

Esses eritrócitos deformados e rígidos, devido ao dano persistente da membrana eritrocitária associado à polimerização da HbS, desencadeiam a ocorrência de vaso-occlusões e hemólise, que são as bases fisiopatológicas determinantes das principais complicações clínicas da AF (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Inicialmente acreditava-se que as células falcizadas eram unicamente responsáveis por causar obstrução no processo de perfusão dos órgãos e consequente infarto tecidual devido à deformabilidade eritrocitária reduzida. No entanto, o processo vaso-oclusivo abrange vários passos, que envolvem interações entre as hemácias falcizadas, leucócitos ativados, células endoteliais ativadas, plaquetas e proteínas plasmáticas (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009).

Os eritrócitos falcizados expressam maior número de moléculas de adesão em sua superfície, favorecendo os processos interativos 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

(FS), a qual o deixa até três vezes mais aderente quando comparado aos eritrócitos normais (ZAGO; PINTO, 2007). Além dessa maior aderência, a exposição de FS foi relacionada com a geração de trombina, substância relacionada à formação de coágulos de fibrina, que também contribuem para a oclusão vascular (Figura 2). Outros componentes proteicos também são expostos durante esse processo e ocorrem principalmente nas células endoteliais, incluindo a expressão de moléculas e proteínas de adesão tais como ICAM-I, VCAM-I, as selectinas, entre outras. Nesse fenômeno, também participam proteínas solúveis de adesão como a trombospondina, fator von Willebrand e glicolipídios sulfatados. Sendo assim, a vaso-oclusão é um processo que abrange fatores que se interligam e se retroalimentam, desencadeando os fenômenos inflamatórios (Hebbel 2000; Frenette e Atweh 2007).

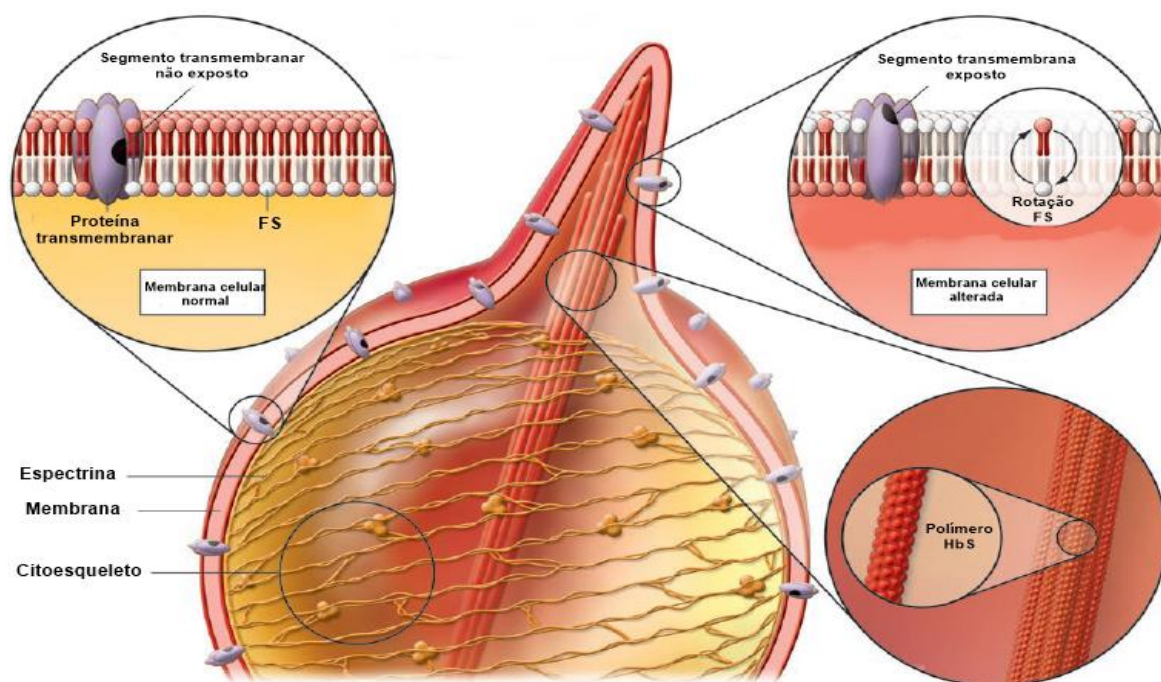


Figura 2- Alteração estrutural da membrana eritrocitária por polímeros de hemoglobina S. A desoxigenação da HbS favorece a formação dos polímeros, levando a mudanças conformacionais no citoesqueleto que, por sua vez, dão origem a característica falciforme da hemácia. Subsequente a polimerização, as protrusões formadas decorrentes da interrupção da ligação da membrana celular com o citoesqueleto resultam na exposição de epítomos de proteínas transmembranar e na composição de fosfatidilserina (FS) entre o interior e o exterior da célula. Adaptado de (Frenette e Atweh, 2007).

Os pacientes com AF apresentam intensa hemólise, uma vez que o processo de falcização modifica as propriedades da membrana celular das hemácias e as tornam menos flexíveis, permanecendo na circulação de dez a vinte dias. O processo hemolítico ocorre principalmente extravascularmente pelo sistema reticuloendotelial, que reconhece a lesão celular e promove a eritrofagocitose. Mas, esses processos

hemolíticos podem ocorrer intravascularmente, com subsequente liberação de hemoglobina e arginase (STEINBERG, 2008).

A hemólise intravascular apresenta impacto direto na redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), importante regulador do tônus vascular e inibidor da ativação plaquetária e da expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais. Tal fato ocorre porque durante a hemólise esta molécula reage rapidamente com a hemoglobina livre, produzindo nitrato, metemoglobina e Fe-nitrosil-hemoglobina. Além disso, a arginase liberada metaboliza o aminoácido arginina em ornitina, diminuindo assim o substrato necessário para a síntese de NO. Dessa forma, a depleção de NO promove a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária e expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, devido ao retardo do fluxo sanguíneo, favorece a falcização das hemácias e ocorrência de fenômenos vaso-oclusivos (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Portanto, a AF apresenta um quadro com complicações inflamatórias crônicas que são desencadeadas por três mecanismos inter-relacionados e concomitantes: processos vaso-oclusivo, hemolítico e inflamatório (ZAGO; PINTO, 2007).

2.1.3 Complicações clínicas

A falcização das hemácias é consequência direta da presença de HbS, porém a polimerização por si só não explica a fisiopatologia da AF. O desfecho clínico dessa doença é decorrente dos efeitos pleiotrópicos que se seguem e favorecem os eventos vaso-oclusivos e hemolíticos, responsáveis por conduzir uma ampla variedade de complicações. Dessa forma, a AF está associada a uma heterogeneidade clínica incomum para uma doença monogênica (DRISS et al., 2009).

Embora seja um distúrbio genético fundamentalmente do sangue, a AF é uma condição multissistêmica, que acomete praticamente todos os órgãos (Figura 3). Os indivíduos portadores de AF são assintomáticos durante os primeiros meses de vida, isto porque os níveis de HbF têm uma produção significativa, mas à medida que a síntese de cadeias da γ -globina é substituída pela síntese de cadeias β , a concentração de HbS aumenta proporcionalmente e, conseqüentemente, começam a surgir as complicações da doença. Esta transição ocorre em taxas diferentes entre os indivíduos, mas em alguns, os níveis de HbS podem ser alcançados após a oitava

semana de vida e complicações potencialmente fatais podem ocorrer a partir dessa idade (QUINN, 2013).

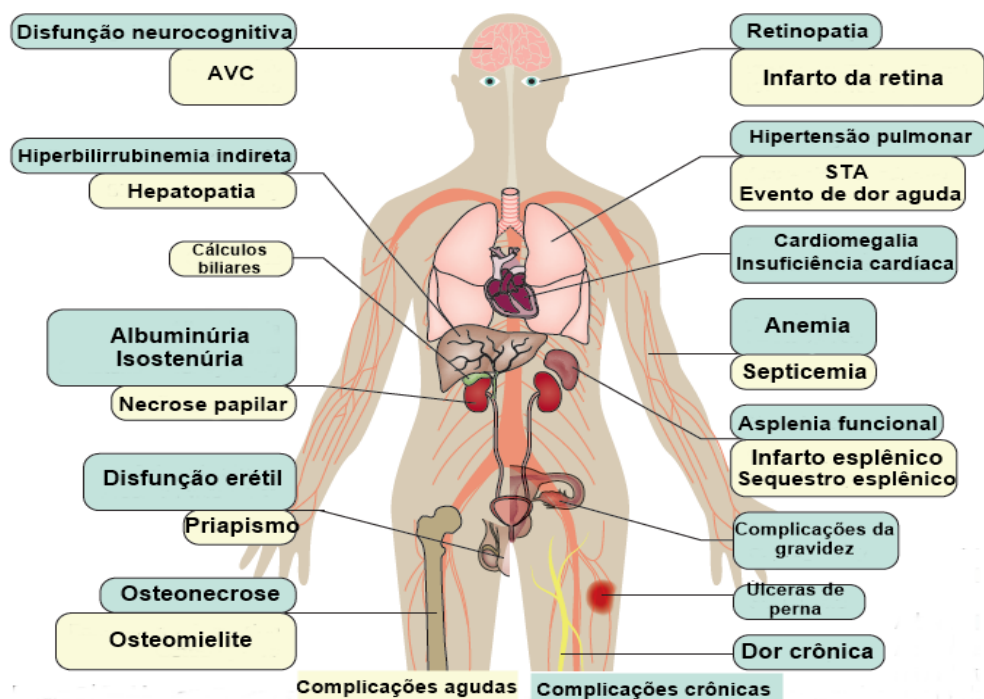


Figura 3- Complicações clínicas da doença falciforme. Adaptado de (Kato et al., 2018).

A AF é reconhecida como uma doença de natureza crônica, mas muitas de suas complicações são agudas (BALLAS et al., 2012; KATO et al., 2018). Certas complicações clínicas se desenvolvem no início da infância, enquanto há outras que normalmente não se apresentam até a adolescência ou início da idade adulta (MCGANN; NERO; WARE, 2017).

As crises vaso-oclusivas (CVOs) são os eventos clínicos mais comumente encontrados em pacientes com AF, sendo responsáveis por provocar isquemia tecidual acompanhada de danos vasculares e inflamação, que resultam em episódios dolorosos intensos. Por esse motivo são consideradas as causas mais comuns de hospitalização e sua frequência é variável entre os pacientes, de modo que a ocorrência de mais de três episódios dolorosos por ano que requerem hospitalização está associada a uma expectativa de vida reduzida. Os primeiros eventos vaso-oclusivos ocorrem em bebês e crianças pequenas através de uma condição chamada de dactilite, um inchaço agudo e doloroso no dorso das mãos e/ou pés resultante do infarto da medula óssea desses ossos. Em crianças mais velhas e pacientes adultos, os episódios dolorosos agudos ocorrem em locais mais específicos, tais como o

esterno, as costelas, os braços ou as pernas (MCGANN; NERO; WARE, 2017; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Frequentemente as crises dolorosas precedem o início de outras complicações da AF, tais como a síndrome torácica aguda (STA). Esta é caracterizada por infiltrado pulmonar e um quadro clínico variável, incluindo dor torácica e febre, acompanhados de sintomas de doença pulmonar, como taquipneia, dispneia, tosse ou hemoptise. Essa complicação é uma das principais causas de morte entre os pacientes com AF e a segunda maior causa de admissão hospitalar, apresentando uma incidência de 12,8 eventos a cada cem pacientes/ano (BALLAS et al., 2012; CASTRO et al., 1994; GUALANDRO; FONSECA; GUALANDRO, 2007; QUINN, 2013).

O sequestro esplênico agudo (SEA) é uma complicação comum e grave que acomete até 30% das crianças com AF, sendo uma das principais causas de mortalidade infantil (KATO et al., 2018; OWUSU-OFORI; REMMINGTON, 2017). Esse desfecho é caracterizado pelo rápido inchaço do baço que ocorre devido a vaso-occlusão de eritrócitos que ficam aprisionados nos sinusóides esplênicos e, conseqüentemente, leva a um quadro clínico de anemia grave e hipovolemia. Crianças com SEA frequentemente requerem hospitalização e terapia transfusional, e além disso, devido à alta taxa de recorrência desse evento a esplenectomia é necessária (BALLAS et al., 2012; BROUSSE et al., 2012).

Outro evento agudo que contribui significativamente para morbimortalidade de pacientes com AF é o acidente vascular cerebral (AVC), definido como uma síndrome neurológica aguda secundária à obstrução de uma artéria ou hemorragia, resultando em isquemia e/ou sinais neurológicos (BALLAS et al., 2010). Na AF, o AVC do tipo isquêmico ocorre predominantemente nas crianças, enquanto nos adultos é mais comum o AVC hemorrágico. As crianças com AF possuem um risco de 300 vezes maior de desenvolver AVC do que a população pediátrica em geral, ocorrendo em aproximadamente 11% dos indivíduos até os 20 anos de idade (OHENE-FREMPONG et al., 1998). Os mecanismos fisiopatológicos da AF contribuintes para o desfecho dessa complicação incluem o aumento de adesão das hemácias falcizadas, ativação endotelial anormal, respostas inflamatórias e coagulação desregulada. (MALOWANY; BUTANY, 2012; STROUSE; LANZKRON; URRUTIA, 2011).

O maior fator de risco para o desenvolvimento de AVC tem sido confirmado através da detecção de velocidade elevada do fluxo sanguíneo cerebral em

segmentos arteriais do polígono de Willis através do exame *Doppler Transcraniano* (DTC). Este exame por ultrassonografia é utilizado como ferramenta de triagem e estratificação clínica para a prevenção primária ao AVC, uma vez que o risco para a ocorrência desse evento é diretamente proporcional ao aumento da velocidade média nas artérias cerebrais (ADAMS, 2014; ADAMS et al., 1998, 2004).

Crianças com AF apresentam DTC ainda maiores (Velocidade de fluxo 130-140 cm/s) do que crianças sem AF (Velocidade de fluxo 90-100 cm/s), devido a anemia. Velocidades de fluxo cerebral acima de 140 cm/s podem indicar uma estenose cerebral ou apenas um aumento geral no fluxo sanguíneo cerebral (HOPPE, 2005). Crianças com AF e DTC alterado (Velocidade de fluxo ≥ 200 cm/s) apresentam 44 vezes mais chances de desenvolver um AVC do que as que têm DTC normal (Velocidade de fluxo ≤ 170 cm/s). Entretanto, o valor de 200 cm/s não é absoluto, uma vez que pacientes que apresentam DTC em faixa condicional (Velocidade de fluxo 170-199 cm/s) também apresentam elevado risco de desenvolver o AVC (ADAMS et al., 1992, 1997; FLANAGAN et al., 2011). Com base na estratificação de risco determinada pelas velocidades do DTC, os pacientes podem ser submetidos a esquemas profiláticos de transfusões periódicas (BREWIN; KAYA; CHAKRAVORTY, 2017; STEINBERG, 2005).

Das complicações do trato geniturinário na AF, outra que é comum é o priapismo, visto que aproximadamente 30-45% dos pacientes do sexo masculino apresentará pelo menos 1 episódio de priapismo durante a vida (RACHID-FILHO et al., 2009). Este evento caracteriza-se por ereção persistente e dolorosa do pênis sem que ocorra o estímulo sexual. Na AF, os eventos de priapismo são do tipo isquêmico ou de baixo fluxo, no qual a baixa oxigenação no corpo cavernoso durante a ereção normal predispõe a falcização dos eritrócitos, com consequente estase venosa, que desencadeia uma reação inflamatória e pode levar subsequentemente a impotência. Clinicamente, esta condição pode ocorrer como episódios agudos, com duração prolongada por mais de quatro horas, ou apresentar-se com crises repetidas de curta duração, que pode evoluir para forma aguda (ADEYOJU et al., 2002; CHINEGWUNDOH; ANIE, 2017).

Dentre as complicações crônicas, a osteonecrose é uma lesão musculoesquelética grave bastante frequente, acometendo cerca de 50% dos pacientes adultos portadores de AF. Este fenótipo doloroso e debilitante torna-se mais

susceptível para se desenvolver devido à microcirculação óssea apresentar baixo fluxo sanguíneo, favorecendo assim a ocorrência da falcização das hemácias (SILVA JUNIOR; DAHER; ROCHA, 2012). Essa complicação progressiva afeta principalmente os ossos longos, podendo acometer as vértebras e costelas. Além disso, estudos demonstraram que a idade, hematócrito elevado, eventos vaso-oclusivos recorrentes e coexistência com α -talassemia são fatores de risco para o desenvolvimento da osteonecrose (DRISS et al., 2009; MARTI-CARVAJAL; SOLA; AGREDA-PEREZ, 2016; MILNER et al., 1991).

Outra complicação comum é o desenvolvimento de úlceras de membros inferiores (UMI), sendo esta uma das complicações cutâneas mais frequentes na anemia falciforme. Acomete entre 5% e 10% dos pacientes e, como a incidência geográfica é variável, pode atingir 50% daqueles que residem em áreas tropicais. Essa condição crônica e dolorosa ocorre em áreas com menos gordura subcutânea e pele fina, sendo os locais mais propícios os maléolos medial e lateral, apresentando cicatrização lenta e alta taxa de recorrência (MINNITI et al., 2010; STEINBERG, 2008). A fisiopatologia relacionada a este evento é multifatorial, incluindo como fatores contribuintes as infecções, traumatismo, vasoconstrição excessiva, trombose e redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (MINNITI; KATO, 2016; UMEH et al., 2017).

Além dessas complicações, outra que é comum nos indivíduos com AF é a colelitíase. Um fator de risco para o desenvolvimento dessa complicação é a hemólise crônica, característica da doença falciforme, visto que a destruição prematura dos eritrócitos falcizados resulta no aumento dos níveis de bilirrubina indireta e precipitação dos cristais de bilirrubinato de cálcio, que por sua vez leva a formação dos cálculos biliares (AL TALHI et al., 2017; ISSA, 2010). Nos pacientes com AF a prevalência de colelitíase é alta e aumenta progressivamente com a idade, cuja variação é de cerca de 15% em crianças e aumenta para mais de 50% em adultos (CURRÒ et al., 2007; GOODWIN et al., 2017).

Dessa forma, pode-se observar que uma das características marcantes da anemia falciforme é a variabilidade de suas complicações clínicas. Estas são decorrentes dos eventos vaso-oclusivos e do quadro hemolítico, que apresentam papel determinante no desenvolvimento das crises dolorosas, STA, AVC, UMI, priapismo, osteonecrose, entre outras complicações. Porém, as razões para essa

heterogeneidade fenotípica ainda não são completamente compreendidas, e em parte pode ser explicada por fatores ambientais e socioeconômicos, mas associado a tal fato, variações moleculares foram observadas como moduladores fenotípicos da AF (DRISS et al., 2009; HABARA; STEINBERG, 2016).

2.1.4 Moduladores genéticos da Anemia Falciforme

Subjacente à mutação pontual que origina a AF, existe uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes quanto ao seu desfecho clínico. Até o momento, dois moduladores genéticos clássicos bem estabelecidos na literatura são os haplótipos β^S e a coexistência com a alfa talassemia (FERTRIN; COSTA, 2010; HIGGS, 2013; HIGGS; WOOD, 2008; LETTRE et al., 2008).

Os haplótipos da anemia falciforme são definidos por padrões de polimorfismos do DNA ligados ao *cluster* da β globina (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989). Estes padrões foram determinados ao caracterizar a região flanqueadora do gene da β globina, usando sítios de clivagem de endonucleases de restrição, que sugeriram a origem independente da mutação β^S em cinco regiões específicas e só posteriormente espalhou-se pelo mundo. Tais haplótipos são nomeados de acordo com a região geográfica de origem e maior prevalência, sendo designados de Senegal (SEN), Benin (BEN), Bantu ou República Centro-Africana (CAR), Camarões (CAM) e árabe-indiano (ARB ou SAU) (KULOZIK et al., 1987; LAPOUNIÉROULIE et al., 1992; PAGNIER et al., 1984). Além desses, outros haplótipos menos frequentes, denominados de atípicos, são ocasionados por vários mecanismos genéticos, tais como alterações genéticas nos sítios polimórficos de restrição e conversão gênica e, devido a tal fato, não se enquadram nos cinco padrões bem estabelecidos (ZAGO et al., 2000).

O curso clínico da AF tem sido associado com os referidos haplótipos, uma vez que os polimorfismos genéticos em *cis*, herdados juntamente com o gene β^S , podem influenciar a expressão do gene γ -globina e, conseqüentemente, nos níveis de HbF (LU; STEINBERG, 1996; STEINBERG, 2005). Os haplótipos SEN e SAU/ARB produzem níveis mais altos de HbF e estão associados à evolução clínica mais branda da AF e com menor ocorrência de dano orgânico, enquanto haplótipo CAR está associado aos níveis mais baixos de HbF e conseqüentemente com a pior gravidade clínica da doença. Os pacientes com os haplótipos BEN e CAM exibem quadros clínicos intermediários (LOGGETTO, 2013).

As concentrações de HbF variam de 1% a 30% entre os pacientes com AF, no qual vários determinantes genéticos evidenciaram contribuir para a heterogeneidade dos níveis basais dessa hemoglobina (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Dentre estes, o mais associado é o polimorfismo presente na região promotora (-158 C>T; rs7482144) do gene *HBG2*, em portadores dos haplótipos SEN e ARB, que está relacionado com uma maior produção de cadeias globínicas G_γ , levando ao aumento da HbF (GILMAN; HUISMAN, 1985; STEINBERG, 2009). No entanto, mesmo entre os indivíduos portadores deste polimorfismo, existe uma variabilidade significativa de níveis de HbF, sugerindo que haja ação adicional de outros elementos regulatórios. Por esse motivo, a associação dos haplótipos β^S com a gravidade clínica da AF deve ser interpretada cautelosamente, visto que o valor prognóstico de um haplótipo conhecido em um indivíduo é limitado (STEINBERG, 2005).

No Brasil, estudos referentes à distribuição de haplótipos ligados ao gene da HbS mostraram o predomínio do haplótipo CAR seguido do BEN (ZAGO; PINTO, 2007). Essa distribuição é condizente com a origem histórica dos escravos trazidos ao Brasil, de modo que o haplótipo CAR é mais comumente encontrado no estado de Pernambuco, Rio Grande do Norte, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Ceará e Pará (AURICCHIO et al., 2007; BELISÁRIO; VIANA, 2010; BEZERRA et al., 2007; CABRAL et al., 2011; CARVALHO-DOS SANTOS et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 1996; FLEURY, 2007; GONCALVES et al., 1994; LEMOS CARDOSO; GUERREIRO, 2006; LOGGETTO, 2013; LYRA et al., 2005; OKUMURA; LOBO; BONINI-DOMINGOS, 2013; PANTE-DE-SOUSA et al., 1998; SILVA FILHO et al., 2012; SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009; ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992).

Outro importante modulador da heterogeneidade fenotípica da AF é a co-herança com a α -talassemia. Esta hemoglobinopatia constitui um grupo de distúrbios hereditários causados pela diminuição ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias globínicas do tipo alfa da hemoglobina, decorrentes de mutações pontuais ou deleções nos genes $\alpha 1$ e/ou $\alpha 2$, localizados no braço curto do cromossomo 16. Dentre as causas da alfa talassemia, a mutação mais prevalente no Brasil é a deleção de 3.7 kb ($-\alpha^{3.7}$) originada por *crossing-over* desigual entre os genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (BELISÁRIO; VIANA, 2010).

A α -talassemia modula a AF reduzindo a concentração intracelular de HbS e, conseqüentemente, diminui o dano celular induzido pela formação do polímero de

HbS nos eritrócitos. Além disso, a coexistência da alfa talassemia altera os parâmetros hematológicos e clínicos da anemia falciforme, bem como a frequência de complicações clínicas e, até mesmo, a sobrevida dos indivíduos. Assim, os indivíduos portadores das duas hemoglobinopatias apresentam o volume corpuscular médio (VCM) reduzido, maior concentração de hemoglobina, menor contagem de reticulócitos e redução das taxas de hemólise. Nesse contexto, esta deleção do gene α confere proteção contra fenótipos associados aos processos hemolíticos, tais como UMI, AVC e priapismo. No entanto, os efeitos benéficos da α talassemia são contrapostos pelo aumento da viscosidade sanguínea, que resulta em eventos clínicos decorrentes da vaso-oclusão, como CVOs, STA e osteonecrose (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; NAGEL; STEINBERG, 2001; STEINBERG, 2009; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

Dessa forma, percebe-se então, como os haplótipos ligados ao *cluster* da β globina relacionados com os níveis de HbF e a co-herança com a α talassemia são importantes modificadores do quadro clínico da AF (Figura 4). Porém, estes não são suficientes para elucidar as diferentes expressões fenotípicas observadas nos pacientes com AF. Sendo assim, torna-se necessário estudar outros fatores genéticos moduladores que predisõem os indivíduos a apresentar as diversas complicações clínicas encontradas na AF. Nesse contexto, estudos de associação genética passaram a ser desenvolvidos com o intuito de esclarecer como os subfenótipos desse distúrbio hereditário são modulados por polimorfismos presentes em genes candidatos, como por exemplo, no gene *THBS1* (HABARA; STEINBERG, 2016; PIEL; STEINBERG; REES, 2017; STEINBERG, 2009).



Figura 4- Modificadores genéticos da gravidade fenotípica na doença falciforme. As setas indicam se os moduladores estão associados a um fenótipo mais leve ou mais grave. Como o efeito dos haplótipos na clínica da AF é mediado pelos níveis de HbF, alguns destes apresentam níveis mais elevados e relacionam-se com um melhor prognóstico, enquanto outros apresentam menores níveis dessa Hb e quadro clínico de intermediário a grave. Para o número de genes das globinas alfa, a diminuição da expressão desses genes acarreta em redução da HbS, induzindo a uma menor polimerização e consequentemente a um fenótipo menos severo. Adaptado de (Piel et., 2017).

2.2. TROMBOSPONDINAS

As trombospondinas (TSPs) constituem uma família conservada de proteínas matricelulares, ou seja, elas não apresentam um papel estrutural na matriz extracelular, mas quando incorporadas nesse compartimento são capazes de regular uma variedade de processos biológicos através de interações com diversos receptores de superfície celular e com os componentes da matriz extracelular (STENINA-ADOGNRAVI, 2014).

A diversidade das funções fisiológicas desempenhadas pelas TSPs, decorrentes dos processos interativos inclui: regulação da angiogênese, modulação do sistema imune, biologia vascular, organização do tecido conjuntivo e sinaptogênese (ADAMS; LAWLER, 2011).

Esta família de proteínas codificadas pelo grupamento gênico *THBS* é constituída por cinco membros, sendo cada um deles produto de um gene distinto localizado em cromossomos diferentes, que são divididos em dois subgrupos de acordo com a organização da estrutura molecular. O subgrupo A abrange as proteínas triméricas TSP1 e TSP2, enquanto o subgrupo B inclui as proteínas TSP3, TSP4 e TSP5 que formam pentâmeros. Todas as TSPs compartilham subunidades altamente homólogas no nível proteico, entretanto as regiões gênicas regulatórias são distintas, garantindo que sejam diferencialmente expressas em vários tecidos e, por sua vez, sugere que tais proteínas possuam funções distintas (BONNEFOY; MOURA; HOYLAERTS, 2008).

2.2.1 Gene *THBS1* e Trombospondina 1

Em humanos, o gene *THBS1* está localizado no braço longo do cromossomo 15 (q15) e contém 22 éxons, sendo descritos pelos bancos de dados mais de 6 transcritos *splicing* variantes (figura 5). Tais isoformas, até o momento, não foram completamente exploradas (STENINA-ADOGNRAVI, 2014). Este gene é responsável por codificar a proteína homotrimérica trombospondina 1 (TSP1), sendo cada monômero de proteína constituído por 1152 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 31 aminoácidos (HUANG et al., 2017).

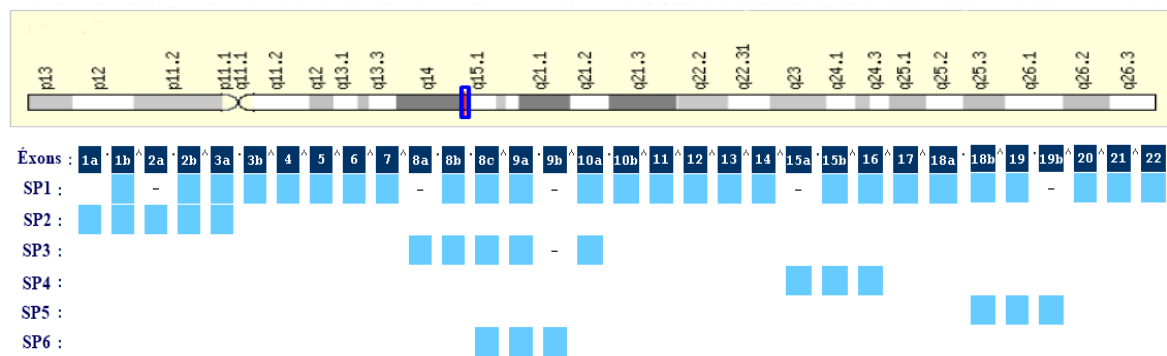


Figura 5-Localização e estrutura do gene THBS1. Adaptado de (<http://www.genecards.org>, acesso em 27 de dezembro de 2018).

A TSP1 é o primeiro membro descrito da família das trombospondinas, e assim denominada por ter sido isolada inicialmente dos grânulos α das plaquetas circulantes após sensibilização com trombina (BAENZIGER; BRODIE; MAJERUS, 1971; LAWLER; SLAYTER; COLIGAN, 1978). Esta proteína também é produzida e secretada por múltiplos tipos celulares, quando ativadas em resposta a algum estresse, incluindo as células endoteliais, os fibroblastos, células do músculo liso, células epiteliais e as células do sistema imune (ROGERS et al., 2014).

A TSP1 é uma glicoproteína homotrimérica de 450 kDa, no qual os monômeros são conectados entre si através de ligações dissulfeto. Cada um desses monômeros compreende um domínio N-terminal globular ligado por um domínio de oligomerização a uma região com homologia para pro-colágeno tipo I ou repetição von Willebrand tipo C (vWC), que é seguida de uma parte central contendo várias regiões de repetições, abrangendo três repetições do tipo 1-TSRs (ou domínio properdina), três repetições do tipo 2 (ou domínio de fator de crescimento epidérmico-EGF) e sete repetições do tipo 3 (ou domínio de ligação ao cálcio), contínua de um domínio C-terminal globular (Figura 6) (CARLSON; LAWLER; MOSHER, 2008; CHISTIAKOV et al., 2017; ESEMUEDE et al., 2004).

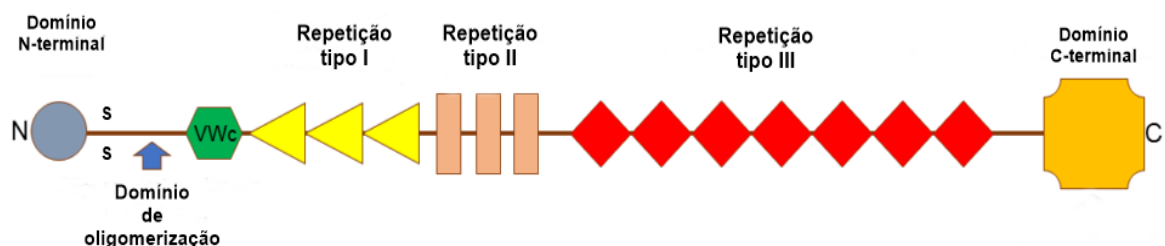


Figura 6- Representação esquemática da organização estrutural da subunidade monomérica da TSP1. Adaptado de (Chistiakov et al. 2017).

O papel multifacetado da TSP1 é decorrente dos múltiplos domínios presentes em sua complexa organização proteica, uma vez que, através deles, ela estabelece interações físicas com uma diversidade de ligantes, incluindo componentes estruturais da matriz extracelular, outras proteínas matricelulares, receptores celulares, fatores de crescimento, citocinas e proteases. Muitas dessas interações foram caracterizadas através de estudos experimentais de pequena escala em sistemas biológicos definidos e fundamentado em informações de banco de dados de interação proteica e da literatura, cujo conhecimento referente ao interatoma da TSP1 é ilustrado na figura 7, embora este não seja completamente delineado. Tais interações envolvem locais de ligação diferentes e podem ocorrer simultaneamente, ativando vias de sinalização que resultam em fenótipos celulares variados e, conseqüentemente, explicam a diversidade de funções dessa proteína (CHEN; HERNDON; LAWLER, 2000; RESOVI et al., 2014).

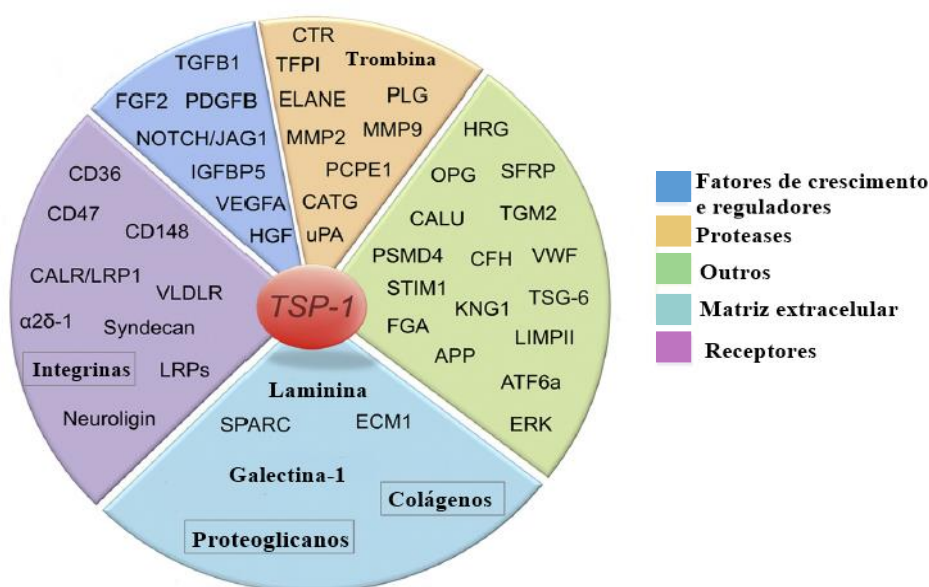


Figura 7- Representação esquemática das principais classes de moléculas que interagem com TSP1. Adaptado de (Resovi et al. 2014).

2.2.2 Funções da TSP1

Os diversos ligantes da TSP1 estão envolvidos em vários processos biológicos importantes, como hemostasia e cicatrização de feridas, inflamação, angiogênese, sinalização do óxido nítrico e adesão celular. Portanto, percebe-se, que a especificidade da atividade da TSP1 é mediada pela disponibilidade das moléculas

que interagem com os vários domínios constituintes dessa proteína (ADAMS; LAWLER, 2011; CHEN; HERNDON; LAWLER, 2000).

Estudos mostraram que a TSP1 é importante no controle inicial da hemostasia no local que ocorre um coágulo irreversível de plaquetas, uma vez que ao ser liberada dos grânulos α de plaquetas após sensibilização com trombina, esta proteína atua contribuindo para a agregação plaquetária ao interagir com o fibrinogênio que se encontra acoplado aos receptores da glicoproteína IIb/IIIa, resultando na formação e estabilização desses macroagregados. Tal fato ocorre principalmente através do domínio de ligação amino-terminal da TSP1, embora também tenha sido associado com o domínio C-terminal e as regiões das repetições TSR1 e TSR3. E apesar do processo de cicatrização de feridas envolver essa fase inicial de hemostasia regulada por plaquetas, acredita-se que a presença de TPS1 é necessária para a função adequada dos macrófagos, que posteriormente afeta os estágios da fibroplasia e formação de tecido de granulação (BONNEFOY; MOURA; HOYLAERTS, 2008; ESEMUEDE et al., 2004).

A TSP1 modula o processo inflamatório por vários mecanismos, que envolvem interações com receptores específicos. Em resposta à inflamação, esta proteína é secretada em concentrações elevadas, induzindo uma intensa resposta quimiotática aos tecidos lesados, facilitando o processo de fagocitose. Esta proteína direciona a fagocitose pelos macrófagos via receptor CD36, que é co-expresso com a TPS1 nessas células. Em outros casos, acredita-se que a TSP1 desempenha um papel importante na redução da inflamação ao interagir com o receptor CD47, levando a ativação das células T reguladoras que são responsáveis pela manutenção das respostas imunes (KRISHNA; GOLLEDGE, 2013; LOPEZ-DEE; PIDCOCK; GUTIERREZ, 2011).

Em relação a angiogênese, a TSP1 foi o primeiro inibidor endógeno identificado relacionado a esse processo. Esta proteína tem papel anti-angiogênico por apresentar efeitos diretos na supressão da atividade do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inibição da migração e indução da apoptose de células endoteliais. Essa função é principalmente mediada através das regiões TSRs que interagem com o receptor CD36 e com as integrinas β 1. Além disso, a TSP1 impede a liberação do VEGF da matriz extracelular através da inibição da atividade da metaloproteinase de

matriz 9 (MMP-9) e até mesmo acoplando-se ao VEGF nesse compartimento (KAZEROUNIAN; LAWLER, 2017; LAWLER; LAWLER, 2012).

O NO é uma molécula que desempenha papéis fisiológicos importantes na vasculatura para regular a angiogênese, o fluxo sanguíneo e a hemostasia. Estudos mostraram que a proteína TSP1 inibe a produção e sinalização do NO nas células vasculares via ativação do receptor CD47 e CD36. A ligação de alta afinidade a CD47 pela TSP1 é mediada pelo seu domínio C-terminal, e subsequentemente, produz sinais que inibem a atividade da guanilato ciclase solúvel (sGC), esta, em condições normais, é estimulada pelo NO e catalisa reações que produzem monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) necessário para a vasodilatação. Enquanto a interação dessa proteína ao receptor CD36, impede a produção de NO ao suprimir a atividade da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) (ISENBERG et al., 2009; ROGERS et al., 2014).

Além disso, a TSP1 participa da biologia vascular como um potente modulador da adesão celular. Uma vez que esta proteína tem a capacidade de interagir tanto com as células falcizadas quanto com componentes das células endoteliais, tais como o receptor CD36 e a integrina $\alpha_v\beta_3$ e, conseqüentemente, contribui para os fenômenos vaso-oclusivos. Tal fato é facilitado em pacientes com anemia falciforme, por ter sido demonstrado que os mesmos apresentam níveis elevados de fatores (hipóxia, trombina, fator de necrose tecidual, fator ativador de plaquetas e interleucina-1) contribuintes para a expressão de receptores de adesão celular por células endoteliais (HEBBEL, 2000; TARABOLETTI et al., 1990).

Diante da multifuncionalidade da TSP1, o gene *THSB1* se mostra um interessante alvo de estudo, pois está envolvido em vários aspectos fisiopatológicos que são importantes na AF, tais como inflamação, adesão vascular e produção de óxido nítrico. Além disto, a identificação de novos fatores de risco genético associados às repercussões clínicas na AF torna-se uma importante ferramenta para a determinação de marcadores prognósticos.

2.3. TSP1 E POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Estudos demonstraram que a concentração de TSP1 circulante encontra-se elevada em algumas patologias, incluindo a doença falciforme (BROWNE et al., 1996; FAULCON et al., 2013; NOVELLI et al., 2012). Novelli et al. (2012) encontraram nos

indivíduos com AF, níveis plasmáticos elevados dessa proteína durante os eventos vaso-oclusivos agudos, quando comparados com pacientes em estado estacionário e controles saudáveis.

Faulcon et al. (2013), por sua vez, evidenciaram níveis aumentados de TSP1 plasmática em crianças com AF que desenvolveram infarto cerebral silencioso (SCI), em comparação com pacientes que não apresentaram esta complicação, sugerindo que esses indivíduos exibem um risco aumentado à resposta inflamatória, observada nestes casos devido ao recorrente processo de isquemia/reperfusão e reoxigenação.

Diante desse contexto, associado à importância da natureza multifuncional da proteína TSP1, o gene *THBS1* tornou-se um dos genes candidatos nas pesquisas em busca de novos moduladores genéticos das complicações clínicas da AF. Além disso, vários estudos de associação genética encontraram SNPs ligados à função endotelial, a vias de inflamação e a biologia do óxido nítrico, sendo estes aspectos relacionados aos subfenótipos da anemia falciforme (DRISS et al., 2009; STEINBERG, 2009; STEINBERG; ADEWOYE, 2006).

Apesar de vários estudos analisarem polimorfismos no gene *THBS1* em algumas condições clínicas, como doenças cardiovasculares (STENINA; TOPOL; PLOW, 2007) e câncer (HONG et al., 2015; LIN et al., 2012), apenas a pesquisa desenvolvida por Jacob et al. (2017) investigou SNPs neste gene a fim de avaliá-lo quanto à possível modulação na AF. Neste, encontraram associação de dois polimorfismos no gene *THBS1* (rs1478604 e rs1478605) com hipertensão arterial pulmonar estimada pela velocidade da regurgitação tricúspide em pacientes com anemia falciforme.

Dessa forma, nós hipotetizamos que variações genéticas no gene *THBS1* podem contribuir com a marcada variação fenotípica observada nos pacientes com AF. Neste sentido, duas variantes genéticas no gene *THBS1* foram investigadas no presente estudo: *THBS1**711 A>C (rs17633107) e *THBS1* -296A>G (rs1478605).

O polimorfismo rs17633107 (A>C) localiza-se na região 3' UTR do gene *THBS1* e apresenta-se como um *TagSNP*, estando em alto desequilíbrio de ligação com outros sete SNPs: rs1051442, rs41315060, rs17632916, rs954152, rs2228263, rs146948724 e rs45461294. Dentre estes, apenas três (rs1051442, rs41315060, rs954152) estão localizados na região 3' UTR do mesmo gene, um é variante sinônima (rs2228263) e os demais SNPs estão em regiões intrônicas. Funcionalmente, o polimorfismo rs17633107 tem sido descrito como sítio de ligação para micro-RNAs,

podendo ter consequências na expressão gênica. O banco de dados miRdSNP (<http://mirdsnp.ccr.buffalo.edu/index.php>), traz duas possibilidades de miRNA que podem se ligar na posição do SNP (miR-1 e miR-98). Em relação ao polimorfismo rs1478605 (A>G), localizado na posição -296 não traduzida do gene *THBS1*, também é do tipo *TagSNP* e marca outros cinco SNPs: rs1478604, rs34034211, rs3830465, rs2664141, rs5812128. Dentre estes, apenas o rs1478604 está localizado na região 5'UTR do mesmo gene, enquanto os demais estão em regiões intrônicas. De acordo com o banco de dados Ensembl, a presença do alelo G no SNP rs1478605 confere uma alteração no sítio de ligação do fator de transcrição CTCF, podendo, assim, tornar a expressão do transcrito diminuída. Além disto, análise bioinformática para este mesmo SNP identificou um sítio de ligação para o fator de transcrição CP2, que também regula o gene da alfa-globina (JACOB et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a possível associação de polimorfismos do gene *THBS1* com o desenvolvimento das principais complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme acompanhados no serviço de hematologia da fundação HEMOPE, no estado de Pernambuco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Descrever os dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos com anemia falciforme acompanhados na Fundação Hemope, avaliando a frequência das complicações clínicas e os dados laboratoriais dos respectivos indivíduos;
- 2- Verificar a possível associação entre os polimorfismos *THBS1**711 A>C (rs17633107) e *THBS1* -296A>G (rs1478605) no gene *THBS1* e a ocorrência das principais complicações clínicas em pacientes com AF;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo coorte transversal retrospectivo com comparação de grupos. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN/UFPE), o qual ofereceu todo suporte necessário para realização dos testes moleculares, contando com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) como instituição coparticipante, onde foram coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

4.2 DEFINIÇÃO DE GRUPOS

A amostra analisada foi constituída de pacientes com AF, não relacionados e de ambos os sexos, acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE, em Recife – PE.

Após análise de 1008 pacientes com AF por meio dos relatos encontrados em seus prontuários, 43 foram excluídos do estudo por apresentarem acompanhamento ambulatorial irregular e/ou perda de seguimento, de modo que 965 foram selecionados. Dos prontuários foram obtidas informações sobre os respectivos cursos clínicos e dados laboratoriais, sendo realizada a divisão dos indivíduos em três grupos, analisados de modo compartimentalizado, de acordo com a ocorrência das principais complicações clínicas e dos resultados do exame DTC por faixa etária. Todas as complicações clínicas registradas adequadamente nos prontuários, desde o nascimento até a data da avaliação final (12/2018), foram computadas. Os pacientes foram alocados nos seguintes grupos:

- a) Grupo I: composto por pacientes com idade de 1 a 24 anos que desenvolveram AVC, dactilite, sequestro esplênico e que apresentaram os resultados das velocidades do fluxo sanguíneo cerebral através do DTC foram divididos em diferentes subgrupos, a saber:
 - i. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram AVC: composto por indivíduos que apresentaram registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica;
 - ii. Subgrupo de indivíduos que apresentaram os resultados de DTC são alocados nos seguintes agrupamentos: normal (pacientes com média

- da velocidade máxima de fluxo sanguíneo < 170 cm/s), condicionante (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo entre 170 – 199 cm/s) e alto risco (pacientes com média da velocidade máxima de fluxo sanguíneo ≥ 200 cm/s);
- iii. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram doença cerebrovascular (DCV): composto por indivíduos que apresentaram AVC confirmado e por indivíduos com elevada faixa de risco para ocorrência de AVC determinada pela alta velocidade detectada pelo DTC (≥ 200 cm/s);
 - iv. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram sequestro esplênico: composto por indivíduos que apresentaram esplenomegalia acompanhada pela queda nos níveis basais de hemoglobina e hiperplasia compensatória da medula óssea;
 - v. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram dactilite: composto por indivíduos que apresentam edema de mãos e pés com dor e/ou calor local;
- b) Grupo II: Composto por pacientes a partir de 25 anos de idade que desenvolveram úlceras de perna, osteonecrose, priapismo e colelitíase foram divididos em diferentes subgrupos, a saber:
- i. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram úlceras de membros inferiores: composto por indivíduos que apresentaram relatos médicos de desenvolvimento de úlceras de perna.
 - ii. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram osteonecrose: composto por indivíduos que apresentaram exames de ressonância magnética e/ou raio-X mostrando lesão óssea, além de queixas ósseo-articulares e diagnóstico confirmado por ortopedista;
 - iii. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram priapismo: composto por indivíduos do sexo masculino que apresentaram registro único ou recorrente de priapismo relatado em prontuário;
 - iv. Subgrupo de indivíduos que desenvolveram colelitíase: composto por indivíduos que apresentaram registro clínico e laboratorial de cálculos biliares confirmados por ultrassonografia;
- c) Grupo III: composto por pacientes, sem limites de idade, que desenvolveram síndrome torácica aguda (STA). Os critérios utilizados

para a definição desse evento clínico foram os seguintes: indivíduos que apresentaram radiografia do tórax mostrando a presença de infiltrado pulmonar. Esta complicação clínica foi avaliada nesse grupo por ser comumente desenvolvida nos pacientes com AF independente da idade. Além disso, os indivíduos foram analisados de acordo com o número de crises vaso-oclusivas (CVOs) passíveis de internação reportadas ao ano (categorizadas em <3 CVOs/ano, >3 CVOs/ano e >6 CVOs/ano);

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE (Nº do parecer: 2.551.759) (Anexo A). Após a aprovação, este trabalho foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A fundação de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE) foi incluída no presente trabalho como coparticipante, pois os pacientes foram obtidos da mesma.

Todos os pacientes envolvidos foram orientados sobre a proposta do projeto e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP.

4.4 COLETA DE MATERIAL

De todos os indivíduos que se dispuseram a participar da pesquisa, após assinatura do TCLE, foram realizadas coletas de amostras de sangue para realização das análises moleculares. A cada convocação feita por telefone ou durante as consultas ambulatoriais de rotina, cerca de 4,0 mL de sangue periférico foram coletados em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para realização dos experimentos.

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

4.5 ANÁLISE LABORATORIAL

As análises dos dados laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação de hemoglobinas) foram obtidos a partir 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 HU, no caso dos indivíduos que fazem uso do fármaco.

4.6 ANÁLISES MOLECULARES

4.6.1 Extração do DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos do sangue periférico pela técnica de fenol-clorofórmio modificada, estabelecida por Davis et al., (1986). A pureza do DNA foi avaliada utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA).

4.6.2 Análise molecular dos polimorfismos

A seleção dos SNPs foi realizada com o auxílio do banco de dados Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Os critérios de seleção foram que os polimorfismos fossem do tipo *TagSNPs*, com frequência do alelo menor (MAF) igual ou superior a 10% nas populações europeia, africana e ameríndia, considerando as respectivas subpopulações CEU, YRI e PUR. Estas populações refletem o padrão miscigenado do país, baseado no seu processo de colonização.

Foram selecionados para este estudo dois SNPs localizados no gene *THBS1*, *THBS**711 A>C (rs17633107) e *THBS1* -296A>G (rs1478605), presentes nas regiões 3'UTR e 5'UTR, respectivamente. O polimorfismo rs17633107 apresenta um MAF global de 8% e as frequências nas subpopulações CEU, YRI e PUR de 16%, 9% e 10%, respectivamente. No polimorfismo rs1478605 observa-se um MAF global de 42%, sendo dentre as subpopulações mais frequente na população YRI (82%), seguindo de PUR (39%) e CEU (27%).

A genotipagem foi realizada através de PCR em tempo real 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_3100546_10 e C_33546300_20). Para realização desta técnica, foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália), disponibilizado no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental – UFPE.

As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, utilizando 5 µL de Taqman Genotyping Master Mix (Thermofisher, Foster City, EUA), 0,25 µL de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA), 3,75 µL de H₂O ultrapura e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL. A ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a reação de PCR, foi 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).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas por contagem direta. Para verificar se as frequências estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de distribuição de χ^2 . O teste χ^2 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 complicações 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*) e Stata Statistic/Data Analysis versão 12 (*Stata corporation*, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS COM AF

Foram incluídos 965 indivíduos no estudo, dos quais foram analisados seus prontuários médicos, cuja mediana de idade foi de 20 anos (01 – 70). Baseados na ocorrência das principais complicações clínicas, incluindo a identificação das velocidades do fluxo sanguíneo cerebral através do DTC, e de acordo com a idade, como mencionado anteriormente, 572 (59,3%) indivíduos foram classificados no grupo I e 393 (40,7 %) indivíduos foram classificados no grupo II. Os dados das características laboratoriais de ambos grupos e da amostra populacional geral, que representa os pacientes alocados no grupo III, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Características laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme incluídos no estudo.

Características laboratoriais	Grupo I		Grupo II		Grupo III	
	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo
RBC (x10 ¹² células/ μ L)	2,59	1,64 – 4,98	2,50	1,5 – 4,56	2,54	1,5 – 4,98
Hb (g/dL)	7,85	4,2 – 11,6	7,8	4,9 – 11,2	7,8	4,2 – 11,6
Ht (%)	22,9	2,43 – 35,1	23,8	7,4 – 33,6	23,4	2,43 – 35,1
VCM(fL)	88,1	53,4 – 116,3	95,0	65,0 – 121,7	90,7	53,4 – 121,7
HCM(g/dL)	29,4	19,2 – 38,6	31,6	19,2 – 40,9	30,3	19,2 – 40,9
Reticulócitos (%)	10,0	1,5 – 32,0	9,7	1,3 – 27,9	9,9	1,3 – 32,0
Leucócitos (x10 ⁶ /L)	13,8	2,1 – 48,9	11,5	4,5 – 32,0	12,6	2,1 – 48,9
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	435	114 – 981	399	115,7 – 925	416	114 – 981
BT (mg/dL)	2,22	0,21 – 39,0	2,97	0,25 – 37,02	2,59	0,21 – 39,0
BI (mg/dL)	1,79	0,14 – 11,0	2,26	0,13 – 36,19	2,0	0,13 – 36,19
LDH (U/L)	827	124 – 2756	812,5	192 – 3692	823	124 – 3692

Rbc=Hemácias; Hb=Hemoglobina; Ht=Hematócrito; VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; BT=Bilirrubina total; BI= Bilirrubina indireta; LDH= Lactato desidrogenase;

A mediana de idade dos pacientes pertencentes ao grupo I foi de 12 anos, com intervalo de 01 – 24 anos. Destes, 183 (32,0 %) desenvolveram pelo menos uma das complicações clínicas analisadas (AVC, DCVs, sequestro esplênico, dactilite) e 456 (79,7%) apresentaram o exame DTC determinado. As complicações clínicas mais

frequentes nesse grupo foram dactilite (27,8%) e sequestro esplênico (19,8%), seguido por DCVs (12,2%) (Tabela 2).

Em relação aos resultados da velocidade de fluxo cerebral avaliado pelo DTC, 324 (56,6%) pacientes foram classificados como DTC normal, 90 (15,7%) como DTC condicionante e 42 (7,3%) como DTC de alto risco. A taxa de ocorrência de desenvolvimento de AVC nos referidos grupos foi de 2,4% para pacientes com DTC normal, 0,9% para pacientes com DTC na faixa condicionante e 2,4% para pacientes com DTC de alto risco.

Pacientes analisados que nunca realizaram o exame de DTC (54 pacientes), que apresentaram DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica, 24 pacientes) ou inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados, 5 pacientes) foram excluídos da análise.

Tabela 2-Caracterização demográfica e clínica dos pacientes com AF classificados no grupo I incluídos no estudo.

Características dos pacientes classificados no grupo I	n (%) (n total= 572)
Sexo	
Feminino	274 (47,9%)
Masculino	298 (52,1%)
Idade	
Intervalo (anos)	01 – 24
Mediana (anos)	12
Acidente vascular cerebral	39 (6,8%)
Intervalo de idade (anos)	01 – 19
Mediana de idade (anos)	06
Doença cerebrovascular	70 (12,2%)
Intervalo de idade (anos)	02 – 24
Mediana de idade (anos)	06
Sequestro Esplênico	113 (19,8%)
Intervalo de idade (anos)	0,30 – 11,28
Mediana de idade (anos)	2,56
Dactilite	159 (27,8%)
Intervalo de idade (anos)	0,02 – 22,95
Mediana de idade (anos)	1,47
Número de complicações dentre as 4 avaliadas nesse grupo	
0	300 (52,4%)
1	183 (32,0%)
2 ou mais	89 (15,6%)

Os pacientes classificados no grupo II apresentaram uma mediana de idade de 35 anos (25 – 70). A frequência de pacientes que desenvolveram pelo menos uma das complicações clínicas analisadas foi de 42% (165 pacientes). Dessas complicações clínicas as mais frequentes foram colelitíase (72,3 %) e UMI (33,1 %), seguidos por osteonecrose (20,1 %) e priapismo (14,2%) (Tabela 3).

Tabela 3- Caracterização demográfica e clínica dos indivíduos AF classificados no grupo II incluídos no estudo

Características dos pacientes classificados no grupo II	n (%) (n total= 393)
Sexo	
Feminino	210 (53,4%)
Masculino	183 (46,6%)
Idade	
Intervalo (anos)	25 – 70
Mediana (anos)	35
Úlceras de membros inferiores	130 (33,1%)
Intervalo de idade (anos)	05 – 56
Mediana de idade (anos)	22
Osteonecrose	79 (20,1%)
Intervalo de idade (anos)	04 – 51
Mediana de idade (anos)	26
Priapismo	56 (14,2%*)
Intervalo de idade (anos)	06 – 51
Mediana de idade (anos)	22
Colelitíase	284 (72,3%)
Intervalo de idade (anos)	03 – 60
Mediana de idade (anos)	20
Número de complicações dentre as 4 avaliadas nesse grupo	
0	59 (15,0%)
1	165 (42,0%)
2 ou mais	169 (43,0%)

*Porcentagem considerando apenas indivíduos do sexo masculino

No que diz respeito ao grupo III, observou-se que 12,5% (121 indivíduos) apresentaram relato de STA, complicação clínica avaliada nesse grupo por ser comumente desenvolvida nos pacientes com AF independente da idade (Tabela 4).

Tabela 4- Caracterização demográfica e clínica dos indivíduos AF classificados no grupo III incluídos no estudo.

Características dos Pacientes Pediátricos e Adultos	n (%) (n total= 965)
Sexo	
Feminino	484 (50,2%)
Masculino	481 (49,8%)
Idade	
Intervalo (anos)	25 – 70
Mediana (anos)	35
Hidroxiuréia	507 (52,5%)
Síndrome torácica aguda	121 (12,5%)
Intervalo de idade (anos)	03 – 50
Mediana de idade (anos)	18

5.2 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE *THBS1*

Após análise dos 965 prontuários dos indivíduos incluídos no estudo, as genotipagens dos polimorfismos *THBS1**711 A>C (rs17633107) e *THBS1* -296 A>G (rs1478605), ambos localizados no gene *THBS1*, foram realizadas em 409 (42,4%) e 899 (93,1%) pacientes, respectivamente. As populações apresentaram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com os três grupos inclusos no estudo, as frequências alélicas e genotípicas podem ser visualizadas na tabela 5.

Tabela 5- Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados nos grupos de pacientes com AF incluídos no estudo.

Grupo I					Grupo II			Grupo III		
Gene <i>THBS1</i> SNP– ID	Genótipos	Frequência genotípica (n e %)	Alelos	Frequência alélica (%)	Frequência genotípica (n e %)	Alelos	Frequência alélica (%)	Frequência genotípica (n e %)	Alelos	Frequência alélica (%)
rs17633107 (A>C)	AA	68 (76,4%)	A	88,2%	257 (80,3%)	A	89,4%	325 (79,5%)	A	89,1%
	AC	21 (23,6%)	C	11,8%	58 (18,1%)	C	10,6%	79 (19,3%)	C	10,9%
	CC	—			5 (1,6%)			5 (1,2%)		
rs1478605 (A>G)	AA	100 (19,4%)	A	44,2%	98 (25,5%)	A	49,2%	198 (22,0%)	A	46,3%
	AG	255 (49,5%)	G	55,8%	182 (47,4%)	G	50,8%	437 (48,6%)	G	53,7%
	GG	160 (31,1%)			104 (27,1%)			264 (29,4%)		

5.3 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *THBS1* E COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DOS PACIENTES COM AF

Para as análises de associação aplicou-se em ambos os polimorfismos os modelos de herança genética recessivo, dominante e codominante, avaliando o que melhor representou à população de estudo.

Para o polimorfismo *THBS1**711 A>C (rs17633107), independente do modelo empregado, não foram encontradas associações entre variáveis clínicas e laboratoriais e a presença desse SNP em pacientes com AF. Neste caso, é importante destacar que as análises foram realizadas apenas nos grupos II e III, devido a frequência de indivíduos com genótipo homozigoto variante (CC) ter sido baixa no presente estudo e, portanto, apresentou uma distribuição genotípica inadequada que impossibilitou a aplicação do modelo de associação no grupo I.

Em relação ao SNP *THBS1* -296A>G (rs1478605), ao aplicar o modelo de associação recessivo, que assume a análise do genótipo homozigoto recessivo (GG) *versus* os genótipos heterozigoto (AG) e homozigoto selvagem (AA), observou-se no grupo I que, dentre as variáveis clínicas estudadas, os indivíduos portadores do genótipo variante (GG) apresentaram menor frequência de desenvolvimento de AVC ($p=0,011$; OR: 0,30; IC 95%:0,11 – 0,78). Em relação às variáveis laboratoriais, os indivíduos homozigotos variantes (GG) apresentaram menores concentrações de

bilirrubina total e indireta ($p=0,038$ e $p=0,045$, respectivamente) e maiores níveis de hemoglobina ($p=0,023$), quando comparados aos indivíduos que possuem os outros genótipos. Os resultados de análise do modelo recessivo frente às variáveis clínicas e laboratoriais dos indivíduos desse grupo são encontrados na tabela 6.

Tabela 6- Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo I incluídos no estudo.

Características	Número de indivíduos <i>N</i> ou Mediana	Homozigoto variante (GG) <i>n</i> (%)	Heterozigoto e homozigoto ancestral (AG+AA) <i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	p-valor
Sexo					
Feminino	249	71(44,4%)	178 (50,1%)	1(ref).1,26 (0,86 – 1,83)	0,253
Masculino	266	89 (55,6%)	177 (49,9%)		
RBC ($\times 10^{12}$ células/μ) (mediana)	2,59	2,55	2,61		0,887
Intervalo	1,64 – 4,98	1,86 – 3,95	1,64 – 4,98		
Hb (g/dL)	7,8	7,9	7,7		0,023*
Intervalo	4,2 – 11,6	4,2 – 10,7	4,8 – 11,6		
Ht (%)	22,9	23,45	22,65		0,099
Intervalo	14,7 – 35,1	15,1 – 32,7	14,7 – 35,1		
VCM (fL) mediana	88,1	88,3	88,0		0,567
Intervalo	53,4 – 116,3	61,8 – 116,3	53,4 – 114,2		
HCM (g/dL) mediana	29,4	29,6	29,3		0,209
Intervalo	19,8 – 38,6	20,0 – 38,6	19,8 – 36,5		
Contagem de Reticulócitos (%), mediana	10,0	9,65	10,25		0,417
Mediana	1,5 – 32,0	1,5 – 26,7	1,5 – 32,0		
Contagem de Leucócitos ($\times 10^6$/L), mediana	14,0	13,8	14,1		0,612
Intervalo	2,1 – 48,9	5,0 – 35,2	2,1 – 48,9		
Contagem de plaquetas ($\times 10^9$/L) mediana	435	456	432,5		0,427
Intervalo	114 – 981	131 – 973	114 – 981		

Tabela 6- Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo I incluídos no estudo.

(continuação)				
BT (mg/dL), mediana	2,22	2,06	2,33	0,038*
Intervalo	0,21 – 39,0	0,21 – 8,29	0,25 – 39,0	
BI (mg/dL), mediana	1,79	1,68	1,8	0,045*
Intervalo	0,14 – 11,0	0,14 – 7,28	0,17 – 11	
LDH (U/L), mediana	827	802,5	834	0,394
Intervalo	124 – 2756	272 – 2219	124 – 2756	
AVC				
Sim	39	5 (3,1%)	34 (9,7%)	1(ref).0,30
Não	473	155 (96,9%)	318 (90,3%)	(0,11 – 0,78)
DTC				
Normal	299	96 (71,6%)	203 (69,5%)	
Condicionante	86	26 (19,4%)	60 (20,5%)	0,901
Alto risco	41	12 (9,0%)	29 (10,0%)	
DCVs				
Sim	69	16 (13,6%)	53 (19,3%)	
Não	324	102 (86,4%)	222 (80,7%)	0,195
Sequestro Esplênico				
Sim	106	32 (20,0%)	74 (21,0%)	1(ref).0,94
Não	407	128 (80,0%)	279 (79,0%)	(0,59 – 1,50)
Dactilite				
Sim	148	39 (24,4%)	109 (30,9%)	1(ref).0,72
Não	365	121(75,6%)	244 (69,1%)	(0,47 – 1,10)

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

Rbc=Hemácias; Hb=Hemoglobina; Ht=Hematócrito; VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; BT=Bilirrubina total; BI= Bilirrubina indireta; LDH= Lactato desidrogenase;

Ao analisar o SNP *THBS1* -296A>G (rs1478605) frente ao desenvolvimento de AVC, observou-se que a frequência do alelo selvagem (A) no grupo que desenvolveu esse desfecho foi de 56,4% e do alelo variante (G) foi de 43,6%. A análise alélica mostrou que o alelo selvagem A demonstrou associação como fator de risco para a ocorrência de AVC ($p = 0,02$; OR: 1,70; IC 95%: 1,07 – 2,71).

Com relação às análises de associação nos grupos II e III, não foram encontradas associações significativas entre o SNP rs1478605 (A>G) e as complicações clínicas avaliadas nesses grupos ao empregar o modelo recessivo de associação genética (Material Suplementar).

No grupo I o impacto do polimorfismo *THBS1* -296A>G (rs1478605), entre os indivíduos GG *versus* AG e AA, foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento de AVC. Nessa análise, observou-se que os pacientes com o genótipo homozigoto variante (GG) apresentaram a média de seguimento para o desenvolvimento de AVC de 23,32 anos (IC95%: 22,74 a 23,90), enquanto os pacientes com genótipos

homozigoto selvagem e heterozigoto (AA+AG) apresentaram um segmento médio de 22,09 anos (IC95%: 21,47 a 22,70) ($p=0,018$) (Figura 8).

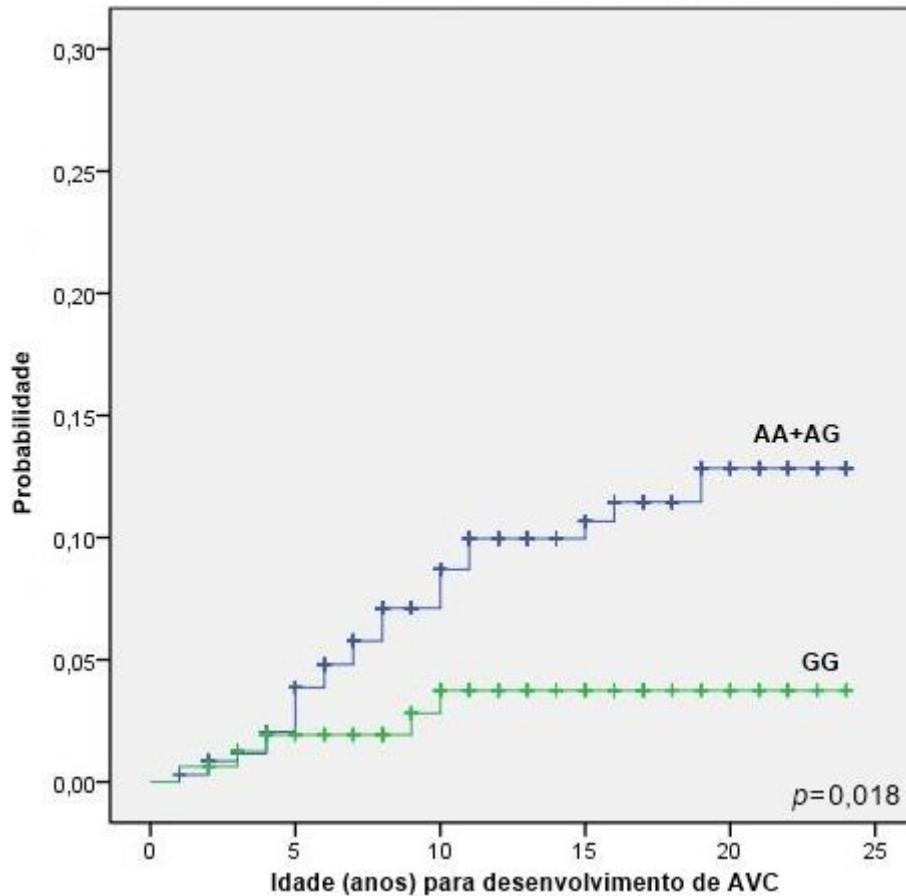


Figura 8- Probabilidade de desenvolvimento de acidente vascular cerebral (AVC) empregando o modelo recessivo de análise genética para o polimorfismo rs1478605 (A>G) nos pacientes com AF classificados no grupo I.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que o polimorfismo *THBS1* -296A>G (rs1478605), um *TagSNP* localizado na 5'UTR do gene *THBS1*, está associado com o desenvolvimento de AVC em pacientes com AF, de modo que foi verificado que o genótipo GG atua como fator de proteção contra esse desfecho, enquanto o alelo A demonstrou associação com o risco de desenvolver AVC. Além disto, este estudo mostrou que os indivíduos com os genótipos heterozigotos e homozigoto ancestral (AA e AG) desenvolvem AVC em um menor intervalo de tempo quando comparados com os indivíduos de genótipo homozigoto variante (GG). Tais associações, até onde se sabe, não foram reportadas anteriormente na literatura. No que diz respeito ao polimorfismo *THBS**711 A>C (rs17633107), não foi observada associação com o desenvolvimento de nenhuma das complicações clínicas dos indivíduos com AF.

Atualmente, a ferramenta prognóstica disponível para prevenção primária de AVC é o rastreamento com DTC, que reduz significativamente a incidência dessa complicação em crianças uma vez que possibilita intervenção precoce nos indivíduos com alterações na velocidade do fluxo sanguíneo cerebral através de transfusões profiláticas (CONNES; VERLHAC; BERNAUDIN, 2013). Entretanto, apesar da terapia transfusional periódica e ininterrupta ser considerada satisfatória, ela não reduz completamente novos casos nem a reincidência do AVC (ADAMS; BRAMBILLA, 2005; KWIATKOWSKI et al., 2011; SCOTHORN et al., 2002). Aliado a isso, a especificidade da técnica do DTC é relativamente baixa, afetando a correta estratificação do risco de AVC, e nem sempre esse programa de triagem é aderido em países em desenvolvimento (MAZZUCCO et al., 2017).

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

Vários estudos sugerem que alterações genéticas podem influenciar o desenvolvimento do AVC (BELISÁRIO et al., 2015; DOMINGOS et al., 2014; FLANAGAN et al., 2011, 2013; SEBASTIANI et al., 2005; SILVA FILHO et al., 2011; VOETSCH et al., 2007). Entretanto, os resultados da literatura acerca dos fatores de risco associados ao desenvolvimento dessa complicação clínica em indivíduos com

AF são controversos. Um fator de risco genético bem caracterizado é o efeito protetor da co-herança com a α -talassemia, porém isso não explica toda a contribuição genética para o desenvolvimento desse desfecho (Belisário et al. 2018). Apesar da etiologia do AVC não ser bem compreendida, estudos indicam que os principais candidatos para a avaliação da predisposição dessa complicação incluem genes envolvidos na lesão endotelial, inflamação, angiogênese, regulação do tônus vascular e coagulação (Adams et al. 1994; Adams et al. 2003; Driscoll et al. 2003; Connes et al. 2013).

No presente estudo foi avaliado polimorfismos no gene *THBS1*, que se torna promissor na compreensão do quadro fisiopatológico da AF devido a TSP1 participar de diversos processos biológicos, tais como inflamação, adesão celular, angiogênese e biodisponibilidade de óxido nítrico, que são considerados fatores desencadeantes de eventos patológicos, como o AVC (Lawler e Lawler 2012). Além do mais, níveis aumentados de TSP1 plasmática já foram evidenciados em indivíduos com AF (Conran et al. 2009; Garrido et al. 2017; Adegoke et al. 2018).

O único trabalho publicado com os SNPs rs17633107(A>C) e rs1478605 (A>G) em relação à AF foi desenvolvido por Jacob et al. (2017), analisando-os em duas coortes (teste e validação) de indivíduos com AF provenientes de estudos multicêntricos oriundos dos Estados Unidos e Reino Unido. Estes autores demonstraram na coorte teste uma associação do rs1478605 (A>G) com proteção a ocorrência de alterações na pressão sistólica da artéria pulmonar estimada pela ecocardiografia, que é um método preditor de hipertensão arterial pulmonar nos pacientes com AF, por outro lado, não foi encontrada associação dessa complicação para o rs17633107 (A>C). Embora o resultado não tenha se repetido na coorte de validação, os autores sugeriram que o SNP rs1478605 (A>G) pode influenciar a regulação da transcrição do gene *THBS1* e a expressão da proteína TSP1, visto que essa variante se localiza próximo ao local de início da transcrição desse gene. Ademais, ao realizarem análise de bioinformática para essa variante, identificaram um sítio de ligação para o fator de transcrição CP2, que é reconhecido pelo seu papel de regular o gene alfa-globina (JACOB et al., 2017). No presente estudo, a insuficiência de dados ecocardiográficos, com diagnóstico de hipertensão pulmonar, nos prontuários dos pacientes com AF impossibilitou análises com relação a essa complicação.

Pelo fato do polimorfismo rs17633107 (A>C) do gene *THBS1* estar em alto desequilíbrio de ligação (rs1051442, rs41315060, rs17632916, rs954152, rs2228263, rs146948724 e rs45461294), a não associação encontrada nesta pesquisa indica que os SNPs marcados por esse *TagSNP* também teriam grandes chances de não apresentar associação.

Devido a poucos relatos na literatura analisando o polimorfismo rs1478605 (A>G), foram avaliadas as variantes em alto desequilíbrio de ligação com ele e verificou-se que apenas o rs1478604 (A>G) está em uma região regulatória (5'UTR) do gene *THBS1*, podendo estar envolvido na regulação transcricional do gene *THBS1* devido a sua proximidade com o sítio de início da transcrição. Vale ressaltar que no estudo de Jacob et al. (2017), citado anteriormente, a influência do polimorfismo rs1478604 (A>G) também demonstrou associação significativa com hipertensão arterial pulmonar em pacientes com AF. Com relação a este polimorfismo, a literatura mostra sua associação com complicações vasculares e disfunção endotelial. A exemplo disto, no estudo desenvolvido por Della-Morte et al. (2012) foi encontrada uma associação significativa do alelo G deste polimorfismo com o aumento do risco de placa aterosclerótica com superfície irregular em indivíduos dominicanos.

É sabido que os pacientes com AF apresentam um quadro de intensa hemólise e devido a isso são encontrados níveis aumentados de hemoglobina plasmática que sequestram o óxido nítrico e, conseqüentemente, diminui sua disponibilidade, favorecendo a vasoconstrição e levando ao desenvolvimento de algumas complicações clínicas, como o AVC (STEINBERG, 2008). Esta complicação, que na AF foi mais relacionada ao fenótipo hemolítico, apresenta uma fisiopatologia multifatorial, de modo que outros mecanismos envolvidos e inter-relacionados na sua etiologia incluem adesão eritrocitária, ativação endotelial e aumento de mediadores inflamatórios e adesivos. Outros fatores apontados como moduladores de risco para o desenvolvimento de AVC são os baixos níveis de hemoglobina basal, aumento na contagem de reticulócitos, comprometimento do débito cardíaco e infecções recentes (BELISÁRIO et al., 2018; FASANO; MEIER; HULBERT, 2014; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; OHENE-FREMPONG et al., 1998). Diante disso, nossos dados sugerem que pacientes com genótipo homozigoto variante (GG) para o rs1478605 (A>G) desenvolvem menos eventos hemolíticos, onde apresentaram menores níveis de bilirrubinas e maiores níveis de hemoglobina.

Nesse contexto, estudos têm demonstrado a desregulação da homeostase do NO mediada pela atividade da TSP1 e, somada à depleção que já ocorre devido a hemólise crônica, a atividade desse vasodilatador pode ser amplamente comprometida, aumentando a susceptibilidade do desenvolvimento de AVC nos indivíduos com AF. Além disso, a TSP1 também desempenha um papel na adesão celular, favorecendo a ocorrência de eventos vaso-oclusivos que são igualmente determinantes para a ocorrência de AVC (ISENBERG et al., 2009; ROGERS et al., 2014).

Dessa forma, acredita-se que o polimorfismo rs1478605 (A>G) pode comprometer os níveis de expressão de TSP1 visto que a alteração do alelo A faz com que a ligação ao fator de transcrição CTCF seja perdida e, assim, uma possível explicação para a associação encontrada no presente estudo é que os indivíduos heterozigotos e homozigotos selvagem (AG e AA) apresentem níveis mais elevados de TSP1. Porém, são necessários estudos funcionais que mostrem que o produto do gene *THBS1* não está em quantidade e/ou função adequada em pacientes com a clínica mais grave. Entretanto, para a realização dessas análises, é necessário desenvolver um trabalho prospectivo, visto que os pacientes com AF sofrem inúmeras intervenções clínicas após o desenvolvimento do AVC, como o uso de hidroxiuréia e transfusões crônicas, para evitar um novo evento clínico.

7 CONCLUSÕES

- O polimorfismo *THBS1**711 A>C (rs17633107) não se mostrou associado com o desenvolvimento das principais complicações clínicas dos pacientes com AF na amostra populacional estudada;
- O genótipo GG do polimorfismo *THBS1* -296A>G (rs1478605) demonstrou associação com proteção para a ocorrência de AVC em nossa população de pacientes com AF;
- O alelo A do polimorfismo *THBS1* -296A>G (rs1478605) mostrou-se como fator de risco para a ocorrência de AVC em nossa população de pacientes com AF;
- Pacientes com genótipos heterozigoto e homozigoto selvagem (AG e AA) para o polimorfismo *THBS1* -296A>G (rs1478605) desenvolvem AVC em um menor intervalo de tempo quando comparados aos indivíduos GG na população em estudo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. T. et al. Genetic risk factors for cerebrovascular disease in children with sickle cell disease: design of a case-control association study and genomewide screen. **BMC Medical Genetics**, v. 4, n. 6, 2003.

ADAMS, J. C.; LAWLER, J. The Thrombospondins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 10, 2011.

ADAMS, R. J. et al. Transcranial doppler correlation with cerebral angiography in sickle cell disease. **Stroke**, v. 23, n. 8, p. 1073–1077, 1992.

ADAMS, R. J. et al. Alpha Thalassemia and Stroke Risk in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Hematology**, v. 282, n. 1 994, 1994.

ADAMS, R. J. et al. Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial Doppler. **Annals of Neurology**, v. 42, n. 5, p. 699–704, 1997.

ADAMS, R. J. et al. Prevention of a First Stroke by Transfusions in Children with Sickle Cell Anemia and Abnormal Results on Transcranial Doppler Ultrasonography. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 1, p. 5–11, 1998.

ADAMS, R. J. et al. Risk of stroke and conversion to abnormal TCD in children screened with transcranial doppler (TCD) during the STOP study. **The national sickle cell disease program annual meeting conference proceedings; 2002 sept**, v. 103, n. 10, p. 3, 2004.

ADAMS, R. J. Prevention of stroke in sickle cell anemia. **Journal of Law, Medicine and Ethics**, v. 42, n. 2, p. 135–138, 2014.

ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D. Discontinuing Prophylactic Transfusions Used to Prevent Stroke in Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**, p. 2769–2778, 2005.

ADEGOKE, S. A. et al. Thrombospondin-1 and Vitamin D in Children With Sickle Cell Anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, dez. 2018.

ADEYOJU, A B. et al. Priapism in sickle-cell disease ; incidence , risk factors and complications – an international multicentre study. **BJU International**, v. 90, p. 898–902, 2002.

AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19–27, 2011.

AL TALHI, Y. et al. Laparoscopic cholecystectomy for cholelithiasis in children with sickle cell disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 4, p. 320–326, 2017.

ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2017.

AURICCHIO, M. T. B. M. et al. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. **Human biology**, v. 79, n. 6, p. 667–677, 2007.

AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 375–393, 2017.

BAENZIGER, N. L.; BRODIE, G. N.; MAJERUS, P. W. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 1, p. 240–3, 1971.

BALLAS, S. K. et al. Definitions of the Phenotypic Manifestations of Sickle Cell Disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.

BALLAS, S. K. et al. Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–55, 2012.

BELISÁRIO, A. R. et al. Association between ENPP1 K173Q and stroke in a newborn cohort of 395 Brazilian children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 126, n. 10, p. 2019–2021, 2015.

BELISÁRIO, A. R. et al. Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 2, p. 166–181, 2018.

BELISÁRIO, A. R.; VIANA, M. B. Alpha thalassemia effects on clinical and hematological manifestations of sickle cell disease: A systematic review. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 3, p. 319–330, 2010.

BEZERRA, M. A. C. et al. Molecular variations linked to the grouping of β - and α -globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, v. 31, n. 1, p. 83–88, 2007.

BONNEFOY, A.; MOURA, R.; HOYLAERTS, M. F. Thrombospondins: From structure to therapeutics - The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 5, p. 713–727, 2008.

BREWIN, J.; KAYA, B.; CHAKRAVORTY, S. How I manage sickle cell patients with high transcranial doppler results. **British Journal of Haematology**, v. 179, n. 3, p. 377–388, 2017.

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

BROWNE, P. V. et al. Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 51, n. 4, p. 296–301, 1996.

CABRAL, C. H. K. et al. Determination of β haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 3, p. 421–4, 2011.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A Doença Falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.

CARLSON, C. B.; LAWLER, J.; MOSHER, D. F. Structures of Thrombospondin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 65, n. 5, p. 672–686, 2008.

CARVALHO-DOS SANTOS, B. S. et al. Impact of β S-Globin Haplotypes on Oxidative Stress in Patients with Sickle Cell Anemia in Steady State. **Archives of Medical Research**, v. 43, n. 7, p. 536–540, 2012.

CASTRO, O. et al. The Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Incidence and Risk Factors. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 643–649, 1994.

CHEN, H.; HERNDON, M. E.; LAWLER, J. The cell biology of thrombospondin-1. **Matrix Biology**, v. 19, n. 7, p. 597–614, 2000.

CHINEGWUNDOH, F.; ANIE, K. A. Treatments for priapism in boys and men with sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2017.

CHISTIAKOV, D. A. et al. Thrombospondins: A role in cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1–29, 2017.

CONNES, P.; VERLHAC, S.; BERNAUDIN, F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, p. 484–498, 2013.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n.1, p. 1–16, 2009.

CURRÒ, G. et al. Asymptomatic cholelithiasis in children with sickle cell disease: Early or delayed cholecystectomy? **Annals of Surgery**, v. 245, n. 1, p. 126–129, 2007.

DAVIS, L. ET AL. **Basic Methods in Molecular Biology**. Elsevier Science, 1986.

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

DELLA-MORTE, D. et al. Association between variations in coagulation system genes and carotid plaque. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 323, n. 1–2, p. 93–98, 2012.

DOMINGOS, I. F. et al. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 7, p. 1123–1129, 2014.

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

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

ESEMUEDE, N. et al. The role of thrombospondin-1 in human disease. **Journal of Surgical Research**, v. 122, n. 1, p. 135–142, 2004.

FASANO, R. M.; MEIER, E. R.; HULBERT, M. L. Cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 2014.

FAULCON, L. M. et al. Thrombospondin-1 and L-selectin are Associated with Silent Cerebral Infarct in Children with Sickle Cell Anaemia Lisa. **British Journal of Haematology**, v. 162, n. 3, p. 421–424, 2013.

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

FIGUEIREDO, M. S. et al. Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. **American Journal of Hematology**, v. 53, n. 2, p. 72–76, 1996.

FLANAGAN, J. et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 116, n. 21, p. 6681–6685, 2011.

FLANAGAN, J. M. et al. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. **The American Society of Hematology**, v. 121, n. 16, p. 3237–3246, 2013.

FLEURY, M. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro : Aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 89–93, 2007.

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

GARRIDO, V. T. et al. Association of plasma CD40L with acute chest syndrome in sickle cell anemia. **Cytokine**, v. 97, p. 104–107, 2017.

GILMAN, B. J. G.; HUISMAN, T. DNA Sequence Variation Associated. **Blood**, v. 66, n. 4, p. 783–787, 1985.

GONCALVES, M. S. et al. Sickle cell disease in a Brazilian population from Sao

Paulo: a study of the beta (S) haplotypes. **Human heredity**, v. 44, n. 6, p. 322–7, 1994.

GOODWIN, E. F. et al. Elective cholecystectomy reduces morbidity of cholelithiasis in pediatric sickle cell disease. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 64, n. 1, p. 113–120, 2017.

GUALANDRO, S. F. M.; FONSECA, G. H. H.; GUALANDRO, D. M. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 291–298, 2007.

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

HEBBEL, R. P. Blockade of adhesion of sickle cells to endothelium by monoclonal antibodies. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 1910–1912, 2000.

HIGGS, D. R. The Molecular Basis of α -Thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, 2013.

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11595–11596, 2008.

HONG, B.-B. et al. Association of THBS1 rs1478605 T>C in 5-untranslated regions with the development and progression of gastric cancer. **Biomedical reports**, v. 3, n. 2, p. 207–214, 2015.

HOPPE, C. Defining stroke risk in children with sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 128, n. 6, p. 751–766, 2005.

HUANG, T. et al. Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. **Oncotarget**, v. 5, n. 0, p. 84546–84558, 2017.

ISENBERG, J. S. et al. Regulation of nitric oxide signaling by thrombospondin-1: implications for anti-angiogenic therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 182, 2009.

ISSA, H. Hepatobiliary Manifestations of Sickle Cell Anemia. **Gastroenterology Research**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2010.

JACOB, S. A. et al. Thrombospondin-1 gene polymorphism is associated with estimated pulmonary artery pressure in patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 3, p. 3–6, 2017.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18010, 2018.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical

subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KAZEROUNIAN, S.; LAWLER, J. Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells. **Journal of Cell Communication and Signaling**, p. 1–9, 2017.

KIM, H. T. Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 2 I, p. 559–565, 2007.

KRISHNA, S. M.; GOLLEDGE, J. Review: The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 2, p. 692–706, 2013.

KULOZIK, A E. et al. Fetal Hemoglobin Levels and BS globin Haplotype in a Indian Population With Sickel Cell Disease. **Blood**, v. 69, n. 6, p. 1742–1746, 1987.

KWIATKOWSKI, J. L. et al. Effect of transfusion therapy on transcranial doppler ultrasonography velocities in children with sickle cell disease. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 56, n. 5, p. 777–782, 2011.

LAPOUNIÉROULIE, C. et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Human Genetics**, v. 89, n. 3, p. 333–337, 1992.

LAWLER, J. W.; SLAYTER, H. S.; COLIGAN, J. E. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. **J Biol Chem**, v. 253, n. 23, p. 8609–8616, 1978.

LAWLER, P. R.; LAWLER, J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and-2. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 5, 2012.

LEMOES CARDOSO, G.; GUERREIRO, J. F. African gene flow to North Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. **American Journal of Human Biology**, v. 18, n. 1, p. 93–98, 2006.

LERVOLINO, L. G. et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2011.

LETTRE, G. et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11869–11874, 2008.

LIN, X.-D. et al. Polymorphism of THBS1 rs1478604 A>G in 5-Untranslated Region Is Associated with Lymph Node Metastasis of Gastric Cancer in a Southeast Chinese Population. **DNA and Cell Biology**, v. 31, n. 4, p. 511–519, 2012.

LOGGETTO, S. R. Sickle cell anemia: clinical diversity and beta S-globin haplotypes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, n. 31, p. 155–157, 2013.

LOPEZ-DEE, Z.; PIDCOCK, K.; GUTIERREZ, L. S. Thrombospondin-1: Multiple paths to inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, 2011.

LU, Z.-H.; STEINBERG, M. H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Relation to regulatory sequences cis to the (beta)-globin gene. **Blood**, v. 87, n. 4, p. 1604–1611, 1996.

LYRA, I. M. et al. Clinical , hematological , and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Caderno Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p. 1287–1290, 2005.

MALOWANY, J. I.; BUTANY, J. Pathology of sickle cell disease. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 49–55, 2012.

MARTI-CARVAJAL, A J.; SOLA, I.; AGREDA-PEREZ, L. H. Treatment for avascular necrosis of bone in people with sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 8, 2016.

MAZZUCCO, S. et al. Transcranial Doppler screening for stroke risk in children with sickle cell disease : a systematic review. **Journal of Stroke**, v. 12, n. 6, p. 580–588, 2017.

MCGANN, P. T.; NERO, A. C.; WARE, R. E. G Clinical Features of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology** p. 1–26, 2017.

MILNER, P. F. et al. Sickle Cell Disease as a Cause of Osteonecrosis of the Femoral Head. **The New England Journal of Medicine**, v. 325, p. 1476–1481, 1991.

MINNITI, C. P. et al. Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 10, p. 831–833, 2010.

MINNITI, C. P.; KATO, G. J. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 22–30, 2016.

NAGEL, R. L.; STEINBERG, M. H. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Pediatric Pathology and Molecular Medicine**, v. 20, n. 2, p. 123–136, 2001.

NOVELLI, E. M. et al. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 3, p. 326–330, 2012.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 288–94, 1998.

OKUMURA, J. V.; LOBO, C. L. D. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the diversity in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, p. 71–72, 2013.

OWUSU-OFORI, S.; REMMINGTON, C. Splenectomy versus conservative management for acute sequestration crises in people with sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, 2017.

PAGNIER, J. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 6, p. 1771–1773, 1984.

PANTE-DE-SOUSA, G. et al. Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: The combined effects of slave trade and internal migrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 4, p. 427–430, dez. 1998.

PIEL, F. B. et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: A quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. **The Lancet Global Health**, v. 2, n. 2, 2014.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.

QUINN, C. T. Sickle Cell Disease in Childhood. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, n. 6, p. 1363–1381, 2013.

RACHID-FILHO, D. et al. Treatment of Recurrent Priapism in Sickle Cell Anemia With Finasteride: A New Approach. **Urology**, v. 74, n. 5, p. 1054–1057, 2009.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, 2010.

RESOVI, A. et al. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. **Matrix Biology**, v. 37, p. 83–91, 2014.

ROGERS, N. M. et al. Thrombospondin-1 and CD47 regulation of cardiac, pulmonary and vascular responses in health and disease. **Matrix Biology**, v. 37, p. 92–101, 2014.

RUSANOVA, I. et al. b-Globin Gene Cluster Haplotypes in Sickle Cell Patients from Panamá IRYNA. **American Journal of Hu**, v. 23, n. March, p. 377–380, 2011.

SCOTHORN, D. J. et al. Risk of recurrent stroke in children with sickle cell disease receiving blood transfusion therapy for at least five years after initial stroke. **The Journal of Pediatrics**, v. 140, n. 3, 2002.

SEBASTIANI, P. et al. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat Genet**, v. 37, n. 4, p. 435–440, 2005.

SILVA FILHO, I. L. DA et al. Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 69, n. 3, p. 431–435, 2011.

SILVA FILHO, I. L. DA et al. Sick cell disease: acute clinical manifestations in early childhood and molecular characteristics in a group of children in Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 196–201, 2012.

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

SILVA, L.; GONÇALVES, R. P.; RABENHORST, S. H. B. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 115–118, 2009.

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

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 4, p. 465–481, 2005.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The Scientific World JOURNAL**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

STEINBERG, M. H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **The Scientific World JOURNAL**, v. 9, p. 46–67, 2009.

STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 13, n. 3, p. 131–136, 2006.

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

STENINA-ADOGNRAVI, O. Invoking the power of thrombospondins: Regulation of thrombospondins expression. **Matrix Biology**, v. 37, p. 69–82, 2014.

STENINA, O. I.; TOPOL, E. J.; PLOW, E. F. Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 9, p. 1886–1894, 2007.

STROUSE, J. J.; LANZKRON, S.; URRUTIA, V. The epidemiology, evaluation and treatment of stroke in adults with sickle cell disease. **Expert Review of Hematology**, v. 4, n. 6, p. 597–606, 2011.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, n. 1, p. 66–69, 1989.

TARABOLETTI, G. et al. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 2, p. 765–772, 1990.

UMEH, N. I. et al. The psychosocial impact of leg ulcers in patients with sickle cell disease : I don ' t want them to know my little secret. **Plos One**, v. 12, n. 10, 2017.

VOETSCH, B. et al. Promoter Polymorphisms in the Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Gene: A Novel Risk Factor for Arterial Ischemic Stroke among Young Adults and Children. **Stroke**, v. 38, n. 1, p. 41–49, 2007.

WAGNER, S. C. et al. Neonatal Screening for Hemoglobinopathies : Results of a Public Health System in South Brazil. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 14, n. 4, p. 565–569, 2010.

WARE, R. E. et al. Sickle Cell Disease. **The Lancet**, v. 390, n. 3, p. 311–323, 2017.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704–712, 2001.

ZAGO, M. A. et al. Atypical β S haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **American Journal of Hematology**, v. 63, n. 2, p. 79–84, 2000.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu β s cluster haplotype predominates among Brazilian Blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, n. 3, p. 295–298, 1992.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1- Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo II incluídos no estudo

Características	Número de indivíduos <i>N</i> ou Mediana	Homozigoto variante (GG) <i>n</i> (%)	Heterozigoto e homozigoto ancestral (AG+AA) <i>n</i> (%)	OR (IC 95%)	p-valor
Sexo					
Feminino	206	54 (52,0%)	152 (54,3%)	1(ref). 1,10 (0,70 – 1,72)	0,730
Masculino	178	50 (48,0%)	128 (45,7%)		
RBC (x10¹²células/μ) (mediana)	2,50	2,42	2,51		0,434
Intervalo	1,50 – 4,56	1,7 – 4,43	1,50 – 4,56		
Hb (g/dL)	7,8	7,8	7,8		0,362
Intervalo	4,9 – 11,2	4,9 – 11,2	4,9 – 10,8		
Ht (%)	23,75	23,6	23,9		0,145
Intervalo	7,4 – 33,6	7,4 – 32,3	8,1 – 33,6		
VCM (fL) mediana	95,0	94,7	95,0		0,852
Intervalo	65,0 – 121,7	66,8 – 121,7	65,0 – 117,4		
HCM (g/dL) mediana	31,6	31,7	31,6		0,851
Intervalo	19,2 – 40,9	20,4 – 40,9	19,2 – 39,4		
Contagem de Reticulócitos (%), mediana	9,7	9,6	9,7		0,331
Mediana	1,3 – 27,9	2,6 – 27,9	1,3 – 27,0		
Contagem de Leucócitos (x10⁶/L), mediana	11,5	11,9	11,3		0,805
Intervalo	4,5 – 32,0	5,1 – 21,6	4,5 – 32,0		
Contagem de plaquetas (x10⁹/L) mediana	401	407	399		0,545
Intervalo	115,7 – 925	143 – 775	115,7 – 925		
BT (mg/dL), mediana	2,97	3,18	2,94		0,131
Intervalo	0,25 – 37,0	0,68 – 37,02	0,25 – 15,49		
BI (mg/dL), mediana	2,27	2,56	2,22		0,354
Intervalo	0,13 – 36,1	0,42 – 36,19	0,13 – 14,94		
LDH (U/L), mediana	818	807,5	829		0,544
Intervalo	192 – 3692	219 – 2189	192 – 3692		
UMI					
Sim	127	37 (35,6%)	90 (32,1%)	1(ref). 1,16 (0,72 – 1,87)	0,543
Não	257	67 (64,4%)	190 (67,9%)		

Tabela suplementar 1- Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo II incluídos no estudo

					(continuação)
Osteonecrose					
Sim	76	15 (14,9%)	61 (22,1%)	1(ref). 0,61	0,147
Não	301	86 (85,1%)	215 (77,9%)	(0,33 – 1,14)	
Priapismo					
Sim	55	18 (36,0%)	37 (29,0%)	1(ref). 1,38	0,372
Não	123	32 (64,0%)	91 (71,0%)	(0,69 – 2,76)	
Colelitíase					
Sim	277	76 (73,0%)	201 (71,8%)	1(ref). 1,06	0,898
Não	107	28 (27,0%)	79 (28,2%)	(0,64 – 1,76)	

Rbc=Hemácias; Hb=Hemoglobina; Ht=Hematócrito; VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; BT=Bilirrubina total; BI= Bilirrubina indireta; LDH= Lactato desidrogenase;

Tabela Suplementar 2- Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo III incluídos no estudo.

Características	Número de indivíduos N ou Mediana	Homozigoto variante (GG) n (%)	Heterozigoto e homozigoto ancestral (AG+AA) n (%)	OR (IC 95%)	p-valor
Sexo					
Feminino	455	125 (47,3%)	330 (52,0%)	1(ref). 1,20 (0,90 – 1,60)	0,214
Masculino	444	139 (52,7%)	305 (48,0%)		
RBC (x10¹²células/μ) (mediana)	2,54	2,52	2,56		0,729
Intervalo	1,5 – 4,98	1,7 – 4,43	1,5 – 4,98		
Hb (g/dL)	7,8	7,9	7,8		0,270
Intervalo	4,2 – 11,6	4,2 – 11,2	4,8 – 11,6		
Ht (%)	23,4	23,5	23,3		0,929
Intervalo	7,4 – 35,1	7,4 – 32,7	8,1 – 35,1		
VCM (fL) mediana	90,8	90,0	91		0,853
Intervalo	53,4 – 121,7	61,8 – 121,7	53,4 – 117,4		
HCM (g/dL) mediana	30,3	30,2	30,4		0,655
Intervalo	19,2 – 40,9	20,0 – 40,9	19,2 – 39,4		
Contagem de Reticulócitos (%), mediana	9,9	9,6	9,9		0,921
Mediana	1,3 – 32,0	1,5 – 27,9	1,3 – 32		
Contagem de Leucócitos (x10⁶/L), mediana	12,6	12,8	12,5		0,932
Intervalo	2,1 – 48,9	5,0 – 35,2	2,1 – 48,9		
Contagem de plaquetas (x10⁹/L)mediana	416	428,5	415,5		0,271
Intervalo	114 – 981	131 – 973	114 – 981		
BT (mg/dL), mediana	2,6	2,61	2,6		0,503
Intervalo	0,21 – 39,0	0,21 – 37,02	0,25 – 39		
BI (mg/dL), mediana	2,0	1,99	2,0		0,297
Intervalo	0,13 – 36,1	0,14 – 36,19	0,13 – 14,94		
LDH (U/L), mediana	826	805,5	831		0,341
Intervalo	124 – 3692	219 – 2219	124 – 3692		
Número médio de CVOs/ano					
<3	455	122 (47,1%)	333 (53,4%)		0,19
>3	295	92 (35,5%)	203 (32,6%)		
>6	132	45 (17,4%)	87 (14,0%)		
STA					
Sim	118	33 (12,6%)	85 (13,5%)	1(ref). 0,92 (0,60 – 1,42)	0,746
Não	774	229 (87,4%)	545 (86,5%)		

Tabela Suplementar 2- Modelo recessivo de herança genética do polimorfismo rs1478605 (A>G) nos indivíduos do grupo III incluídos no estudo

(Continuação)

Hidroxiuréia					
Sim	491	146 (55,3%)	345 (54,7%)	1(ref). 1,02	0,883
Não	404	118 (44,7%)	286 (45,3%)	(0,76 – 1,36)	
Rbc=Hemácias; Hb=Hemoglobina; Ht=Hematócrito; VCM=Volume corpuscular médio; HCM=Hemoglobina corpuscular média; BT=Bilirrubina total; BI= Bilirrubina indireta; LDH= Lactato desidrogenase;					

ANEXO A- PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO ESTADO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do gene THBS1 nas manifestações clínicas da anemia falciforme

Pesquisador: Jessica Maria Florencio de Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 74779617.1.3001.5195

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.551.759

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande importância clínica que pode ser utilizada como ferramenta para a determinação de marcadores prognósticos de fenômenos vasocclusivos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 20 de Março de 2018

Assinado por:
Maria Iraci Buarque Valença
(Coordenador)

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Jessica Maria Florencio de Oliveira

Curriculum Vitae

Fevereiro/2019

Dados pessoais

Nome Jessica Maria Florencio de Oliveira

Filiação Manoel do Carmo Oliveira e Maria Aparecida Florencio Oliveira

Nascimento 27/05/1993 - Campina Grande/PB - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Avaliação do gene THBS1 nas manifestações clínicas da anemia falciforme
Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo
Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2012 - 2015** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
Título: Análise do DNA mitocondrial de pacientes com Mucopolissacaridose tipo IV-A no estado da Paraíba
Orientador: Simone Silva dos Santos Lopes
Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Treinamento da Plataforma Brasil (Carga horária: 4h).
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco, HEMOPE, Recife, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em XIV Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares. (Carga horária: 90h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2016 - 2016** Curso de curta duração em Cultivo Celular em Pesquisa. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Inovação Tecnológica na Saúde: TIC'S utilizadas na Área de Saúde. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Como Buscar Artigos Científicos no Século XXI. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em Testes para Detecção de Agentes Genotóxicos. (Carga horária: 12h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Introdução a Biologia Molecular. (Carga horária: 2h).

Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Estudos de Associação Genética em Humanos. (Carga horária: 2h).
XX Encontro de Genética do Nordeste, XX ENGENE, Brasil., ENGENE, Brasil
- 2014 - 2014** Curso de curta duração em Técnicas de Coleta e Identificação de Dípteros. (Carga horária: 12h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Genética Comunitária. (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Vínculo institucional

- 2014 - 2015** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Iniciante Científico do Projeto Intitulado " MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A PRESENÇA DE UM "HOTSPOT" NA PARAÍBA: ANÁLISE HAPLOTÍPICA E DE ANCESTRALIDADE" sob orientação da Professora Doutora Simone Silva dos Santos Lopes.
- 2014 - 2015** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Aluna Extensionista, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Aluna Extensionista Voluntária do Projeto de Extensão intitulado "CONFEÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO PARA AULA PRÁTICA DE GENÉTICA NO ENSINO MÉDIO" sob coordenação da Professora Doutora Simone Silva dos Santos Lopes.
- 2014 - 2015** Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Aluna Extensionista, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Aluna Extensionista Voluntária do Projeto de Extensão intitulado "GENÉTICA VAI À ESCOLA: GENÉTICA NO CONTEXTO ESCOLAR PARA ALUNOS DE ENSINO MÉDIO" sob coordenação da Professora Doutora Simone Silva dos Santos Lopes.
- 2013 - 2014** Vínculo: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário voluntário, Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Estagiária Voluntária do Projeto Intitulado "RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES: RECEPTOR DE TSH (TSHR) E FATOR DE TRANSCRIÇÃO PAX8 EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DO ESTADO DA PARAÍBA" sob orientação da Professora Doutora Simone Silva dos Santos Lopes.
- 2013 - 2014** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Monitoria em Bioquímica Fundamental, Carga horária: 12, Regime: Parcial
Outras informações:
Sob orientação do professor Drº Simão Lindoso de Souza

2. Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Vínculo institucional

- 2016 - 2016** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Parque Tecnológico da Paraíba-PacTcPB, Carga horária: 20, Regime: Parcial

2014 - 2014 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Professora de Biologia, Carga horária: 80, Regime: Integral

Outras informações:
Professora Voluntária da Disciplina de Biologia no Projeto de Extensão intitulado "PRÉ-VESTIBULAR SOLIDÁRIO" sob coordenação do Professor Paulo de Andrade Medeiros, com vínculo ao Programa de Bolsa de Extensão- PROBEX/UFCEG

2013 - 2013 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Professora de Biologia, Carga horária: 80, Regime: Integral

Outras informações:
Professora Voluntária da Disciplina de Biologia no Projeto de Extensão intitulado "PRÉ-VESTIBULAR SOLIDÁRIO" sob coordenação do Professor Paulo de Andrade Medeiros, com vínculo ao Programa de Bolsa de Extensão- PROBEX/UFCEG

3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda em Genética, Regime: Dedicção exclusiva

Projetos

Projetos de pesquisa

2014 – 2014 MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A PRESENÇA DE UM "HOTSPOT" NA PARAÍBA: ANÁLISE HAPLOTÍPICA E DE ANCESTRALIDADE

Descrição: As mucopolissacaridoses (MPS) são doenças de depósito lisossômico (DL), caracterizadas pelo acúmulo intralissossômico de glicosaminoglicanos (GAGs), secundário à deficiência na atividade de uma enzima envolvida na degradação dessas moléculas. A síndrome de Morquio, ou Mucopolissacaridose IV (MPS IV) é caracterizada por baixa estatura, doença óssea grave e inteligência normal. No entanto apresenta um amplo espectro de gravidade das manifestações clínicas associadas. O gene GALNS possui 50kb com 14 exons e 13 introns, e foi mapeado na região 16q24.3, e o cDNA contém 1566 nucleotídeos que codifica um glicopeptídeo com 522 aminoácidos. O Brasil é conhecido como uma nação altamente diversa em etnias, resultante de cinco séculos de intensa miscigenação entre europeus (os colonizadores), africanos (os escravos) e ameríndios (os habitantes nativos do Brasil). Com intuito de responder questões sobre a presença de haplótipos de origem comum e ancestralidades dos pacientes com MPS IV-A do estado, já que a Paraíba possui 28% dos pacientes com MPS IVA do Brasil. A pesquisa realizou a análise molecular dos pacientes com mucopolissacaridose IV-A da Paraíba para identificar a ancestralidade dos pacientes para verificar a origem populacional, o haplótipo fundador e o processo de distribuição da doença.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (4); Doutorado (3);

Integrantes: Jessica Maria Florencio de Oliveira; Simone Silva dos Santos Lopes (Responsável); Micaela de Melo Cordeiro Eulálio; Mayla Aracelli Araujo Dantas; Eliene de França Silva; Paula Frassinetti Vasconcelos de Medeiros; Roberto Giugliani.

2013 - 2014 RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES: RECEPTOR DE TSH (TSHR) E FATOR DE TRANSCRIÇÃO PAX8 EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DO ESTADO DA PARAÍBA

Descrição: O Hipotireoidismo Congênito (HC) pode ser determinado como uma desorganização endócrina, caracterizado pelos níveis reduzidos ou ausência de hormônios tireoidianos presentes no nascimento, resultando numa depleção dos processos metabólicos e dificultando o neurodesenvolvimento. O gene do TSHR ou tireotrofina, localizado no cromossomo 14q31 é prejudicado em suas funções como na intermediação das ações do TSH no crescimento, no metabólico e funções celulares, com intuito terminal de síntese e secreção hormonal (PERONE et al., 2004). A presente pesquisa compreende a realização da genotipagem e identificação de polimorfismos através

do microssatélite D14S616 presente no receptor do TSH em pacientes com hipotireoidismo congênito do Estado da Paraíba, cujo objetivo é analisar as frequências alélicas do microssatélite D14S616 localizados no gene do receptor do TSH nos pacientes com Hipotireoidismo Congênito tratados no Hospital Universitário Alcides Carneiro (HUAC/UFCG) no estado da Paraíba e então comparar o padrão e a frequência dos alelos encontrados na população paraibana com os da população brasileira .

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Jessica Maria Florencio de Oliveira; Simone Silva dos Santos Lopes (Responsável); Anna Brazilina da Costa; Yanne de Oliveira; José Hugo do Rêgo Silva. Projeto de extensão

2014 - 2015 GENÉTICA VAI À ESCOLA: GENÉTICA NO CONTEXTO ESCOLAR PARA ALUNOS DE ENSINO MÉDIO

Descrição: O ensino da biologia com enfoque na genética no ensino médio tem sido a causa de debates em instituições escolares, devido a necessidade de uma melhor preparação do docente para trabalhar conceitos em constante processo de evolução tratados na genética. Há necessidade do uso de metodologias mais eficazes e materiais precisos que permita a vivência do aluno com os temas mais atuais. Os livros didáticos, a estrutura escolar, assim como os docentes muitas vezes não estão plenamente preparados para trabalhar com genética na sala de aula, os docentes dentro da sala de aula não associam os conteúdos ministrados com a realidade na qual estão inseridos. Devido a necessidade que a escola exponha de maneira mais consolidada a visão essencial da genética associando-a com os fatos vivenciados pelos alunos, para que sejam transmitidos os princípios teóricos básicos que exponham melhor a importância da genética. O presente projeto tem como objetivo repassar para professores e alunos do ensino médio de uma escola pública de Campina Grande, conceitos básicos atualizados de genética de forma prático-didática através de vivências e contextualização realizadas em oficinas ministradas nas escolas

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (7); Doutorado (1);

Integrantes: Jessica Maria Florencio de Oliveira; Simone Silva dos Santos Lopes (Responsável); Anna Brazilina da Costa; José Hugo do Rêgo Silva; Denise de Queiroga Nascimento; Geilza Carla de Lima Silva; Josefa Andreza Cantalice Barros; Mayara Gomes da Silva

2014 - 2015 CONFECÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO PARA AULA PRÁTICA DE GENÉTICA NO ENSINO MÉDIO

Descrição: As informações advindas das mais recentes descobertas científicas, especialmente nas áreas da Biologia Molecular e Genética, vêm crescendo de maneira progressiva do meio acadêmico para o público em geral, facilitado por meio de revistas especializadas, bem como os meios de comunicação de massa. No entanto, pesquisas revelam que a maioria dos estudantes do ensino médio e fundamental ainda apresentam uma ideia vaga e sincrética sobre questões simples da biologia. Em face dessa realidade, surge a necessidade de pesquisas em escolas que almejem trazer aos alunos os fins didáticos que os completem e que os facilitem na busca de um bom desempenho. Esse trabalho tem como objetivo confeccionar material didático para aulas práticas de genética em conjunto com professores de Biologia da rede pública de ensino. O projeto será realizado no E.E.E.F.M. Francisco Ernesto Do Rêgo (O Ernestão), pertencentes ao município de Queimadas, Paraíba, bem como no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do departamento de Biologia da UEPB. Serão realizadas reuniões de planejamento e oficinas mensais de ensino didático em confecção de material de aula prática em genética, bem como o acompanhamento da utilização do mesmo. Através do presente estudo, espera-se suplementar a didática dos discentes do ensino médio de maneira a aumentar o rendimento dos alunos pertencentes a rede pública

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (7); Doutorado (2);

Integrantes: Jessica Maria Florencio de Oliveira (Responsável); Simone Silva dos Santos Lopes; Anna Brazilina da Costa; José Hugo do Rêgo Silva; Denise de Queiroga Nascimento; Josefa Andreza Cantalice Barros; Mayara Jesuíno Farias; Walclécio Morais Lira; Nathálya Carvalho Farias

2013 - 2014 PRÉ-VESTIBULAR

Descrição: O PVS é um programa vinculado à Pró-Reitora de Pesquisa e Extensão da UFCG criado em 2000 com objetivo de contribuir para a construção de políticas sociais afirmativas viabilizando a ampliação das condições de acesso e permanência de jovens e adultos de baixa renda na educação superior, especialmente de afro-descendentes e indígenas. Nesta perspectiva o PVS visa: Possibilitar ao público beneficiado a preparação científica e a capacidade de utilizar as diferentes tecnologias relativas às áreas de Linguagens e Códigos, Ciências da Natureza e Matemática e Ciências Humanas, corrigindo distorções do ensino público; Instigar nos participantes o desenvolvimento da capacidade de aprender, criar e formular conhecimentos, de maneira a desenvolver valores e competências que se coadunem com as exigências da sociedade contemporânea; Desenvolver o aprimoramento do aluno como pessoa humana, incluindo a formação ética e a autonomia intelectual, de modo a permitir que este continue aprendendo, de forma autônoma e crítica, em níveis mais complexos de estudos; Oferecer a preparação e as orientações básicas para a integração do aluno ao mundo do trabalho, com competências que garantam seu aprimoramento profissional e permitam acompanhar as mudanças que caracterizam a produção no nosso tempo; Contribuir para a ampliação da capacidade dos alunos de compreender criticamente as causas históricas que limitam o acesso à escola, aos benefícios e às decisões da sociedade em que vivem.

Situação: Concluído **Natureza:** Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (4);

Integrantes: Jessica Maria Florencio de Oliveira (Responsável); ; Denise de Queiroga Nascimento; Geilza Carla de Lima Silva; Mayara Gomes da Silva; Fábio Alves Gomes

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. **OLIVEIRA, J. M. F.**; FRANCO-ALVES, AE; DANTAS, M. A. A. ALUNOS COM DEFICIÊNCIA NA REDE REGULAR DE ENSINO: INCLUSÃO OU INTEGRAÇÃO? In: II Congresso Internacional de Educação Inclusiva e II Jornada Chilena Brasileira de Educação Inclusiva, 2016, Campina Grande. **CINTEDI.**, 2016.

2. FRANCO-ALVES, AE; **OLIVEIRA, J. M. F.**; DANTAS, M. A. A. O ENSINO DE BIOLOGIA PARA DEFICIENTES VISUAIS DO INSTITUTO DOS CEGOS DE CAMPINA GRANDE: EXPLICANDO EMBRIOLOGIA HUMANA COM A VOZ, ARGILA E AS MÃOS In: II Congresso Internacional de Educação Inclusiva e II Jornada Chilena Brasileira de Educação Inclusiva, 2016, Campina Grande. **CINTENDI.**, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BATISTA, JVGF; **OLIVEIRA, J. M. F.**; ARAUJO, AS; ARAUJO, ARL; BEZERRA, MAC. Análise da associação do polimorfismo KL rs9536314 com complicações clínicas da anemia falciforme. In: VIII JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, 2018 **Genética Humana.**, 2018.

2. SOUZA, MBS; MARTINS, DAP; SOBREIRA, MJVC; BATISTA, THC; RAMOS, CMA; XAVIER, AL; **OLIVEIRA, J. M. F.**; ARAUJO, AS; ARAUJO, ARL; BEZERRA, MAC. Avaliação de polimorfismos no gene VDR na susceptibilidade ao desenvolvimento de osteonecrose em pacientes com anemia falciforme. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2017, Curitiba. **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular.**, 2017.

3. BATISTA, JVGF; MARTINS, DAP; DOMINGOS, IF; FALCÃO, DA; **OLIVEIRA, J. M. F.**; XAVIER, AL; ANJOS, AC; ARAUJO, AS; ARAUJO, ARL; BEZERRA, MAC. Expressão diferencial de KLOTO em indivíduos com e sem anemia falciforme. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e

Terapia Celular, 2017, Curitiba.

Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular., 2017.

4. BATISTA, THC; SANTANA, RM; ARCANJO, GS; SANTOS, GM; **OLIVEIRA, J. M. F.**; MARTINS, DAP; ARAUJO, AS; ANJOS, AC; PERES, JC; ARAUJO, ARL; BEZERRA, MAC. Associação da Hemoglobina S com a Hemoglobina N-Baltimore In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

ENGINE., 2016.

5. XAVIER, AL; BATISTA, THC; SANTANA, RM; PACHECO, MFT; ARCANJO, GS; SANTOS, GM; **OLIVEIRA, J. M. F.**; ARAUJO, AS; ARAUJO, ARL; MARTINS, DAP; BEZERRA, MAC. Inheritance of the Bantu/Bantu haplotype causes more severe hemolysis and inflammatory response in children with sickle cell anemia diagnosed through the newborn screening program. In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife.

ENGINE., 2016.

6. SÁ, AKLBCE; ANDREZA, RS; ARCANJO, GS; BATISTA, THC; **OLIVEIRA, J. M. F.**; MARTINS, DAP; RIBEIRO, MF; ARAUJO, AS; ARAUJO, ARL; BEZERRA, MAC. Investigação de hemoglobinas variantes e talassemias em população quilombola de conceição das criolas, Salgueiro- Pernambuco, Brasil In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2016, Florianópolis.

Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular., 2016.

7. SILVA, SL; LIMA, MDBPLV; FERREIRA, AMMS; COSTA, IM; ARCANJO, GS; **OLIVEIRA, J. M. F.**; BEZERRA, MF; BEZERRA, MAC; ARAUJO, ARL; HATZLHOFFER, BLD. Perfil Clínico e Laboratorial da hemofilia A em Pernambuco In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2016, Florianópolis.

Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular., 2016.

8. FARIAS, N. C.; DANTAS, M. A. A.; **OLIVEIRA, J. M. F.**; SILVA, E. F.; EULÁLIO, M. M. C.; NASCIMENTO, D. Q.; BALBINO, VQ; LOPES, S. S. S. There is dutch contribution in the brazilian northeast: genetics analysis of the Gangarras do Bandeira - PE community. In: 62° CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2016, Caxambu.

62° CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA., 2016.

9. **OLIVEIRA, J. M. F.**; BARROS, J. A. C.; EULÁLIO, M. M. C.; LOPES, S. S. S. ESTRATÉGIA METODOLÓGICA PARA O ENSINO E APRENDIZAGEM DE BIOLOGIA: PRÁTICA EDUCATIVA COM A EXTRAÇÃO DO DNA DA BANANA In: I ENCONTRO PARAIBANO DE BIOLOGIA, 2015, Campina Grande.

Ensino de Biologia., 2015.

10. EULÁLIO, M. M. C.; **OLIVEIRA, J. M. F.**; COSTA, A. B; NASCIMENTO, D. Q.; SILVA, G. C. L.; BARROS, J. A. C.; LOPES, S. S. S. GENÉTICA VAI À ESCOLA: GENÉTICA MÉDICA NO CONTEXTO ESCOLAR PARA ALUNOS DE ENSINO MÉDIO In: V Congresso Norte-Nordeste de Genética Médica, 2015, Natal.

Ensino em Genética., 2015.

11. BARROS, J. A. C.; **OLIVEIRA, J. M. F.**; EULÁLIO, M. M. C.; LOPES, S. S. S. INCLUSÃO SOCIAL DE ALUNOS COM DOENÇAS GENÉTICAS NO ÂMBITO ESCOLAR In: I ENCONTRO PARAIBANO DE BIOLOGIA, 2015, Campina Grande.

Ensino de Biologia., 2015.

12. EULÁLIO, M. M. C.; **OLIVEIRA, J. M. F.**; BARROS, J. A. C.; LOPES, S. S. S. O ACONSELHAMENTO GENÉTICO É UM CASO DE SAÚDE PÚBLICA In: I ENCONTRO PARAIBANO DE BIOLOGIA, 2015, Campina Grande.

Genética., 2015.

13. COSTA, A. B; LOPES, S. S. S.; O, Y.; **OLIVEIRA, J. M. F.**; REGO-SILVA, J. H.; SOUZA, L. D.; NASCIMENTO, D. Q.; BARROS, J. A. C.; ROCHA, A. M. ANALISE DE MUTAÇÕES NO GENE DA TIREOGLOBULINA (TG) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DA PARAÍBA In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

GHM-Genética Humana e Médica., 2014. v.10. p.10 – 10

14. **OLIVEIRA, J. M. F.**; O, Y.; REGO-SILVA, J. H.; SOUZA, L. D.; BARROS, J. A. C.; NASCIMENTO, D. Q.; ROCHA, A. M.; LOPES, S. S. S. ANÁLISE DO MICROSSATÉLITE D14S616 LOCALIZADO NO GENE RECEPTOR DO HORMÔNIO RECEPTOR DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DA TIREÓIDE (TSHR) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DA PARAÍBA. In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

GHM-Genética Humana e Médica., 2014. v.10. p.14 - 14

15. REGO-SILVA, J. H.; O, Y.; COSTA, A. B; **OLIVEIRA, J. M. F.**; ROCHA, A. M.; SOUZA, L. D.; LOPES, S. S. S. ANÁLISE DO MICROSSATÉLITE TGRI29 EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DA PARAÍBA In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

GHM-Genética Humana e Médica., 2014. v.10. p.8 - 8

16. O, Y.; **OLIVEIRA, J. M. F.**; COSTA, A. B; REGO-SILVA, J. H.; SOUZA, L. D.; BARROS, J. A. C.; NASCIMENTO, D. Q.; ROCHA, A. M.; LOPES, S. S. S. MICROSSATÉLITE D14S606 NO GENE RECEPTOR DO HORMÔNIO ESTIMULADOR DA TIREÓIDE (RTSH) EM PACIENTES COM HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO DA PARAÍBA: FREQUÊNCIAS GÊNICAS E ALÉLICAS In: XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

GHM-Genética Humana e Médica., 2014. v.10. p.1 - 1

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **OLIVEIRA, J. M. F.**; LOPES, S. S. S.; MEDEIROS, P. F. V. **Complementação da pesquisa de ancestralidade em pacientes com MPSIVA do HUAC**, 2016. (Outra produção técnica)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Orientação de outra natureza

1. Pollyane Ramos Trajano. **Intervenção da fisioterapia na conscientização de lesões osteomusculares em praticantes de crossfit**. 2018. Orientação de outra natureza (Fisioterapia) - Centro Universitário Uninassau.

Eventos

Participação em eventos

1. **VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2018. (Outra)
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE THBS1 NAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME.
2. **VII Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2017. (Outra)
VII Jornada de Pós-graduação em Genética.
3. **I Curso de Inverno em Genética Humana**, 2016. (Outra)
I Curso de Inverno em Genética Humana.
4. Apresentação de Pôster / Paineis no (a) **II CONGRESSO INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO INCLUSIVA E II JORNADA CHILENA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO INCLUSIVA**, 2016. (Congresso)
ALUNOS COM DEFICIÊNCIA NA REDE REGULAR DE ENSINO: INCLUSÃO OU INTEGRAÇÃO?
5. Apresentação de pôster / Paineis no (a) **I ENCONTRO PARAIBANO DE BIOLOGIA**, 2015. (Encontro)
ESTRATÉGIA METODOLÓGICA PARA O ENSINO E APRENDIZAGEM DE BIOLOGIA: PRÁTICA EDUCATIVA COM A EXTRAÇÃO DE DNA.
6. Apresentação de pôster / Paineis no (a) **V CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE GENÉTICA MÉDICA**, 2015. (Congresso)
GENÉTICA VAI À ESCOLA: GENÉTICA MÉDICA NO CONTEXTO ESCOLAR PARA ALUNOS DE ENSINO MÉDIO.

7. **XXII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEPB**, 2015. (Encontro)
MUCOPOLISSACARIDOSE TIPO IV-A PRESENÇA DE UM "HOTSPOT" NA PARAÍBA: ANÁLISE HAPLOTÍPICA E DE ANCESTRALIDADE.
8. **CONGRESSO INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO E INCLUSÃO**, 2014. (Congresso)
CONGRESSO INTERNACIONAL DE EDUCAÇÃO E INCLUSÃO.
9. **I ENCONTRO PERNAMBUCANO DE GENÉTICA FORENSE**, 2014. (Encontro)
I ENCONTRO PERNAMBUCANO DE GENÉTICA FORENSE.
10. **INTRODUÇÃO A BIOLOGIA MOLECULAR**, 2014. (Outra)
INTRODUÇÃO A BIOLOGIA MOLECULAR.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos	18
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	1
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

Produção técnica

Outra produção técnica.....	1
-----------------------------	---

Orientações

Orientação concluída (orientação de outra natureza)	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	3
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (encontro)	7
Participações em eventos (outra)	4
Organização de evento (congresso)	2
Organização de evento (outro)	1
Participação em banca de comissões julgadoras (outra)	1