

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

DIEGO ANTONIO PEREIRA MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE ANXA2 NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA
FALCIFORME**

**Recife
2016**

DIEGO ANTONIO PEREIRA MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE ANXA2 NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

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

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Martins, Diego Antonio Pereira

Associação de variantes genéticas no gene ANXA2 no desenvolvimento de complicações clínicas da anemia falciforme. / Recife: O Autor, 2016.

91 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Antônio Roberto Lucena de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências, apêndices e anexo

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

616.1527

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 483

DIEGO ANTONIO PEREIRA MARTINS

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE ANXA2 NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**

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

Aprovado em 14/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva
Universidade Federal de Pernambuco
(Avaliador interno)

Dr. Kleber Yotsumoto Fertrin
Universidade Estadual de Campinas
(Avaliador externo 1)

Dr. Aderson da Silva Araújo
Fundação de Hematologia de Pernambuco
(Avaliador externo 2)

Segurando em suas mãos dei, quando criança, meus primeiros passos. Hoje, dedico todo este trabalho a vocês, José Martins, Jeciene Amorim e Melissa Rafaella que sempre me apoiaram em tudo. Amo vocês. E a minha amada, Rebeca, por sua dedicação e companheirismo sem medida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, A Deus, que desde muito antes de todos os meus projetos acontecerem, me deu o dom da vida e o de aprender;

A Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao programa de pós graduação em genética, pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa. A Fundação HEMOPE, em especial ao corpo clínico e aos pacientes, pelas amostras fornecidas, bem como toda a sua infra-estrutura, que permitiu a conclusão do projeto;

A FACEPE e ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido durante o meu mestrado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, o qual há quatro anos acreditou em meu potencial. Por todo incentivo e espaço fornecido durante a realização da pesquisa. Por todo conhecimento dividido, as lições científicas e para a vida, ensinadas. Por me mostrar como um profissional responsável deve seguir e por sua grande experiência de vida demonstrada, permitindo meu crescimento pessoal. Pela amizade construída e por todos os conselhos e diretrizes dados, os quais, sem eles eu não seria o que me tornei, meu sincero obrigado;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo, por toda a experiência de vida transmitida, de um jeito que só o mesmo poderia fazê-lo. Por todas as horas que permitiu que eu o importunasse, estando ao seu lado enquanto ele realizava uma análise ou escrevia/revisava um manuscrito, são lições que ficarão por toda a vida. Por todos os *labmeeting's* que tivemos, e pela amizade, meu sincero obrigado.

Agradeço àqueles que forneceram um tipo de suporte emocional que nem sempre pode ser medido em palavras, indo além de recursos materiais, mas cujas ações

constantes de cuidado, orações, carinho e paciência apoiaram minha caminhada a cada momento. Agradeço a minha mãe, Jeciene, minha primeira professora e maior cuidadora; meu pai, José Martins, meu referencial em compromisso e dedicação. Minha irmã, Melissa, minha segunda mãe e grande conselheira; A Ilvio, por todo conhecimento transmitido e amizade consolidada e a Lulu, que mesmo sem me dizer nada com palavras, me ensina a cada dia com sua pureza e inocência. Sem vocês, nada disso seria possível;

A minha amada, Rebeca, a quem tive o grande privilégio de conhecer no fim da minha graduação, onde nela encontrei minha melhor amiga, conselheira, cúmplice, companheira, meu porto seguro. Adjetivos me faltam para descrever-te minha amada, e as palavras me fogem ao tentar falar sobre ti, só consigo dizer que contigo posso sonhar um futuro. Amo-te;

A todos os colegas do NHCL, que merecem muito mais do que nomeações em uma folha de papel; que cada um deles tenha a certeza que têm em mim dívidas de gratidão. Agradeço especialmente a Pedro Luiz, Guilhermy Vitor, George Douglas, ManAlex, Igor Domingos, Matheus Bezerra, Marlon e Diego Falcão por todos os momentos de descontração. Agradeço em especial a Juan Luiz, pelos sete anos de amizade gentilmente a mim cedidos, por todos os conselhos e momentos de descontração. Sei que faremos bons trabalhos onde estivermos, sempre na parceria meu amigo. Meus sinceros agradecimentos a todos;

Ao pessoal do laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Raquel Melo, Fernanda Rodrigues, Renata Scopin, João Agostinho, Gustavo Borges, Ana Paula Nunes, Fernanda Borges, Jaqueline Fernandes, Bruna Fenerich, Silvia Sanchez e tantos outros por todo conhecimento e amizade a mim cedido. Vocês foram fundamentais em minha capacitação profissional e pessoal. Espero poder

auxiliá-los ao retornar para o doutorado. Gostaria de agradecer a Dra. Fabíola Traina por toda confiança depositada durante meu estágio e ao Dr. Rodrigo Calado pelo conhecimento transmitido. Meu muito obrigado a todos;

Por fim, a todos aqueles que contribuíram na minha formação profissional. A todos, os meus sinceros agradecimentos

“Os dois dias mais importantes da sua vida são: o dia em que você nasce, e o dia em que descobre o porquê. ”

(Mark Twain)

RESUMO

Evidências mostram que complicações vasculares exercem papel importante na fisiopatologia da anemia falciforme (AF). Neste sentido, o gene da anexina A2 (*ANXA2*) mostra-se como um alvo molecular promissor na busca de marcadores envolvidos na heterogeneidade clínica da doença, devido seu papel na regulação do metabolismo ósseo e controle da proliferação celular. No presente trabalho foi realizada a caracterização clínica e molecular de 714 pacientes com AF, levando-se em consideração dois polimorfismos de nucleotídeo único em *ANXA2* (*ANXA2**5681 G→A e IVS-14-1046 C→T) previamente publicados. Nenhuma associação foi observada entre a presença do polimorfismo IVS-14-1046 e as variáveis analisadas dos pacientes. Em contrapartida, 21,4% e 46,7% dos pacientes com genótipo selvagem mais heterozigoto (GG + GA) e homozigoto mutado (AA), respectivamente, para o polimorfismo *ANXA2**5681, desenvolveram osteonecrose ($P<0.001$) e 53,9% e 58,7% dos pacientes com mesma combinação genotípica apresentaram úlceras de perna ($P=0.04$). Avaliando o risco cumulativo de para o desenvolvimento da osteonecrose e úlcera observamos que os pacientes com genótipo AA apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento de osteonecrose (88%) que os GG + GA (43%) ($P<0.001$). Este polimorfismo mostrou-se independentemente associado com maior taxa de desenvolvimento da osteonecrose (*hazard ratio*, HR: 2.36, IC95%: 1.45-3.85; $P<0.001$), considerando outros moduladores para osteonecrose como elementos de confundimento, contudo o mesmo não foi observado para as úlceras de perna. Analisando o perfil de expressão de *ANXA2* evidenciamos uma regulação negativa genótipo dependente dos níveis de *ANXA2* em pacientes AF com osteonecrose ($P<0.05$), em amostras pareadas. Em resumo, nossos resultados mostram que o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A está independentemente associado com o desenvolvimento de osteonecrose, mostrando-se como modulador fenotípico na AF (Hb SS).

Palavras-chave: Úlceras de perna. Osteonecrose. Moduladores genéticos.

ABSTRACT

Evidence shows that vascular complications play an important role in the pathophysiology of sickle cell anemia (SCA). In this context, *ANXA2* gene shows up as a promising molecular target in the search for markers involved in the clinical heterogeneity of the disease, due to the role in regulating bone metabolism and control of cell proliferation. In the present work was carried out clinical and molecular characterization of 714 patients with SCA, taking into account two single nucleotide polymorphisms in the *ANXA2* (*ANXA2**5681 G→A and IVS-14-1046 C→T) previously published. No association was observed between the presence of IVS-14-1046 polymorphism and analyzed features of patients. In contrast, 21,4% and 46,7% of patients with wild type genotype more heterozygous (GG + GA) and mutant homozygotes (AA), respectively, for *ANXA2**5681 polymorphism developed osteonecrosis ($P<0.001$) and 53,9% more 58,7% of patients with the same genotype combination showed leg ulcers ($P=0.04$). Evaluating the cumulative risk for developing osteonecrosis and leg ulcers observed that patients with AA genotype had an increased osteonecrosis development rate (88%) than GG + GA (43%) ($P<0.001$). This polymorphism was independently associated with higher rate of development of osteonecrosis (hazard ratio, HR: 2.36; CI95%: 1.45-3.85; $P<0.001$), whereas other modulators for osteonecrosis as confounding elements, but the same was not observed for leg ulcers. Analyzing the expression profile of *ANXA2* we show a genotype dependent negative regulatory of *ANXA2* levels in SCA patients with osteonecrosis ($P<0.05$) in paired samples. Summary, our results show that the polymorphism *ANXA2**5681 G→A is independently associated with the development of osteonecrosis showing up as phenotypic modulator of the SCA (SS-genotyped).

Key words: Leg ulcers. Osteonecrosis. Genetic modulators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA FREQUÊNCIA DO ALELO.....	23
FIGURA 2 - FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME.....	26
FIGURA 3 - SISTEMA A2-P11 NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	38
FIGURA 4 - SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO <i>ANXA2</i> *5681 G→A (RS7170178).....	57
FIGURA 5 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE DEPENDENTE DO GENÓTIPO PARA O POLIMORFISMO <i>ANXA2</i> *5681 G→A (RS7170178).....	61
FIGURA 6 - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE ÚLCERAS DE PERNAS DEPENDENTE DO GENÓTIPO PARA O POLIMORFISMO <i>ANXA2</i> *5681 G→A (RS7170178).....	62
FIGURA 7 - ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DE <i>ANXA2</i> EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PACIENTES COM AF.....	63
FIGURA 8 - NÍVEIS DE <i>ANXA2/GAPDH</i> EM PACIENTES COM AF QUE DESENVOLVERAM OSTEONECROSE DE ACORDO COM OS TRÊS GENÓTIPOS POSSÍVEIS PARA O POLIMORFISMO <i>ANXA2</i> *5681 G→A (RS7170178).....	64
FIGURA SUPLEMENTAR I - PROBABILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE DEPENDENTE DO NÍVEL CATEGÓRICO DE EXPRESSÃO RELATIVA DE <i>ANXA2</i>	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CATEGORIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME.....	28
TABELA 2 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DO <i>CLUSTER</i> β : LOCALIZAÇÃO REFERENTE AO <i>CLUSTER</i> β NO CROMOSSOMO 11 DEPOSITADOS NO BANCO DE DADOS NCBI (ID: U01317).....	48
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DAS REAÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DO <i>CLUSTER</i> DA GLOBINA β	49
TABELA 4 - CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADAS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS DO <i>CLUSTER</i> DA GLOBINA β	49
TABELA 5 - TAMANHO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS E APÓS A CLIVAGEM COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	50
TABELA 6 - SEQUÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> PARA PESQUISA DA DELEÇÃO $\alpha^{3,7KB}$. LOCALIZAÇÃO REFERENTE AO GENE α NO CROMOSSOMO 16 DEPOSITADOS NO BANCO DE DADOS NCBI (ID: J00153).....	51
TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS ACHADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE PACIENTES COM AF DE ACORDO COM O POLIMORFISMO <i>ANXA2</i> *5681 G→A.....	65
TABELA 8 - ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA PARA RISCO DE DESENVOLVIMENTO DA OSTEONECROSE NA AF.....	58
TABELA 9 - ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA PARA RISCO DE DESENVOLVIMENTO DA ÚLCERAS DE PERNA NA AF.....	59
TABELA 10 - ANÁLISE ALÉLICA DO POLIMORFISMO <i>ANXA2</i> *5681 G→A (RS7170178), PARA O DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE.....	60
TABELA SUPLEMENTAR I - COMPARAÇÃO DOS ACHADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE PACIENTES COM AF DE ACORDO COM O POLIMORFISMO IVS-14-1046 C→T.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Item	Definição
$\alpha\alpha$	Haplótipo alfa normal
$\alpha^{3.7Kb}$	Deleção alfa 3.7Kb
β^S	Globina beta falciforme
A	Adenina
AF	Anemia falciforme
Anx2	Anexina A2
ANXA2	Gene da Anexina A2
ARB	Árabe-Indiano
Arg	Arginina
AS	Antisense
ATP	Atípico
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BAN	Bantu
BEM	Benin
BSA	Albumina bovina sérica
C	Citosina
CAM	Camarões
CAR	República Central Africana
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CSCCD	Centro de compreensão sobre a doença falciforme
Ct	Ciclo de Treshold
DF	Doença falciforme
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTC	Doppler transcraniano

EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FA	Fosfatase alcalina
G	Guanina
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
Glu	Ácido glutâmico ou glutamato
HbA ₂	Hemoglobina A ₂
<i>HBB</i>	Gene da Hemoglobina Subunidade Beta
HbF	Hemoglobina fetal
<i>HBG1</i>	Gene da Hemoglobina Subunidade Gamma 1
<i>HBG2</i>	Gene da Hemoglobina Subunidade Gamma 2
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HbS	Hemoglobina S
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HR	<i>Hazard Ratio</i>
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiuréia
IC	Intervalo de Confiança
IVS	Variação de sequência intrônica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHLBI	Instituto nacional do coração, pulmão e sangue
ON	Óxido nítrico
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Plg	Plasminogênio
PN	Plasmina
OS	Fosfatidilserina
RFLP	Polimorfismo por análise de fragmento de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real
S	Sense
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SEM	Senegal
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STA	Síndrome torácica aguda
STOP	Ensaio de prevenção para o AVC na anemia falciforme
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
tPA	Ativador tecidual do plasminogênio
TRIS	Tris (Hidroximetil) aminometano
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNILABE	Unidade de Laboratórios Especializados
Val	Valina

LISTA DE SÍMBOLOS

Item	Definição
%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
cm/s	Centímetros por Segundo
dH ₂ O	Água deionizada
Δ	Delta
HCl	Ácido clorídrico
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
M	Molar
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio
NaCl	Cloreto de Sódio
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
P	Significância
pb	Pares de bases
pH	Potencial de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
U	Unidades
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
X	Número de vezes
Γ	Gama

°C	Graus Célsius
'	Minuto
"	Segundo
=	Igual a
≥	Maior ou igual a
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
<	Menor que

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 ANEMIA FALCIFORME	23
2.1.1 Prevalência	23
2.1.2 Fisiopatologia	24
2.1.3 Complicações clínicas	27
2.1.3.1 Complicações crônicas da anemia falciforme	30
2.2 MARCADORES MOLECULARES	33
2.2.1 Haplótipos do gene da globina β^s	33
2.2.2 Talassemia alfa (α)	34
2.3 ANEXINA A2	35
2.3.1 Polimorfismos no gene da Anexina A2 (<i>ANXA2</i>)	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 CASUÍSTICA	42
4.2 DESENHO DO ESTUDO	45
4.3 ASPECTO ÉTICOS DA PESQUISA	46
4.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA	46
4.5 ANÁLISE MOLECULAR	47
4.5.1 Extração do DNA genômico e avaliação dos marcadores moleculares clássicos	47
4.5.2 Análise dos polimorfismos do gene <i>ANXA2</i>	51
4.5.3 Extração do RNA a partir de leucócitos totais e síntese do DNA complementar (cDNA)	52
4.5.4 Análise do perfil de expressão relativa de <i>ANXA2</i>	53
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5. RESULTADOS	56

5.1 MARCADORES CLÁSSICOS DA ANEMIA FALCIFORME	56
5.2 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE ANXA2	56
5.3 DESFECHO DA OSTEONECROSE E DAS ÚLCERAS DE PERNA EM PACIENTES COM AF <i>VERSUS</i> OS DIFERENTES GENÓTIPOS DE ANXA2*5681 G→A	60
5.4 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DE ANXA2 EM PACIENTES COM AF QUE DESENVOLVERAM OSTEONECROSE E ÚLCERAS DE PERNA	63
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS (RESOLUÇÃO 466/12)	84
APÊNDICE B - CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO	85
APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS RESPONSÁVEIS PELOS MENORES DE 18 ANOS (RESOLUÇÃO 466/12)	86
APÊNDICE D - CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DA CRIANÇA (OU DO MENOR DE IDADE)	87
APÊNDICE E - TABELA SUPLEMENTAR I	88
APÊNDICE F - FIGURA SUPLEMENTAR I	90
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	91

1. INTRODUÇÃO

O termo doença falciforme identifica condições em que à associação da Hemoglobina S (HbS) com outra alteração de Hb estrutural ou talassêmica, levando a um quadro clínico similar ao da anemia falciforme (AF). Esta é caracterizada pela homozigose para a HbS (Hb SS), que apresenta uma grande heterogeneidade fenotípica, variando desde formas clínicas brandas até incapacitantes que cursam com baixas taxas de sobrevida.

As complicações clínicas da AF decorrem inicialmente em resposta à falcização intravascular do eritrócito, com consequente hemólise e desenvolvimento de um processo inflamatório crônico. Esses fatores levam a oclusões vasculares e eventos relacionados, culminando em dor e outras complicações que variam quanto a cronicidade com que acometem os pacientes.

Subjacente à mutação pontual que origina a doença, acredita-se que exista uma heterogeneidade molecular que distingue os pacientes quanto ao seu desfecho clínico. Dentre esses fatores, os mais conhecidos são a coexistência com talassemia alfa (α), os haplótipos ligados ao *cluster* da globina β^S e a concentração da hemoglobina fetal, mas estes não são suficientes para elucidar as diferentes expressões fenotípicas observadas nos pacientes com AF.

Recentemente, diversos fatores de risco emergiram como modificadores genéticos potenciais do curso clínico da AF, dentre eles, o gene *ANXA2* torna-se promissor na compreensão dos fenômenos vasoclusivos, devido ao seu papel no controle da homeostase do endotélio vascular bem como no metabolismo ósseo.

O gene *ANXA2* codifica a proteína Anexina A2 (Anx2), uma proteína da família de proteínas ligadas a fosfolipídios de membrana cálcio dependentes, envolvida em vias de regulação do crescimento de diversos tipos celulares e transdução de sinal, sobretudo no

tecido endotelial, regulando o processo de dissolução da malha de fibrina intravascular (fibrinólise), bem como na osteogênese, modulando o balanço entre o crescimento e a reabsorção óssea. Assim, indivíduos com alterações em *ANXA2* podem apresentar uma predisposição a complicações vasculares decorrentes de eventos trombóticos, sobretudo na microcirculação.

Devido à importância das complicações vasculares na fisiopatologia da AF e considerando que a patogênese da doença envolva interações complexas entre os componentes celulares da circulação e endotélio vascular, refletindo-se no surgimento das complicações clínicas (agudas e crônicas), é teoricamente possível que vias de sinalização ou expressão aberrante de proteínas, como a Anx2, estejam diferencialmente expressos em pacientes com e sem complicações.

Desse modo, a identificação de variáveis genéticas pode ajudar a definir mecanismos fisiopatológicos críticos não evidentes, bem como identificar pacientes com risco aumentado para essas complicações. Sendo assim, estudos de associação genética podem fornecer ferramentas para uma terapêutica mais individualizada, que seja capaz de contribuir para o controle desses fenômenos, minimizando o número de internações, melhorando o suporte clínico a esses indivíduos, bem como restabelecendo a sua qualidade de vida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Prevalência

De acordo com dados do Ministério da Saúde, a prevalência estimada da doença falciforme (DF) é de 25.000 a 30.000 casos, com incidência de 3.500 novos casos por ano, ocorrendo predominantemente, entre os povos de origem africana (Soares *et al.* 2014) (Brasil, 2012). Assim, a homozigose para a HBB^*S , a AF é a doença hereditária monogênica mais comum no mundo (Figura 1) e no Brasil (Cançado & Jesus, 2007). Estima-se que 5-6% da população brasileira seja portadora do alelo β^s e que, a cada ano, nasçam entre 700-1000 crianças portadoras da AF (Lyra *et al.* 2005).

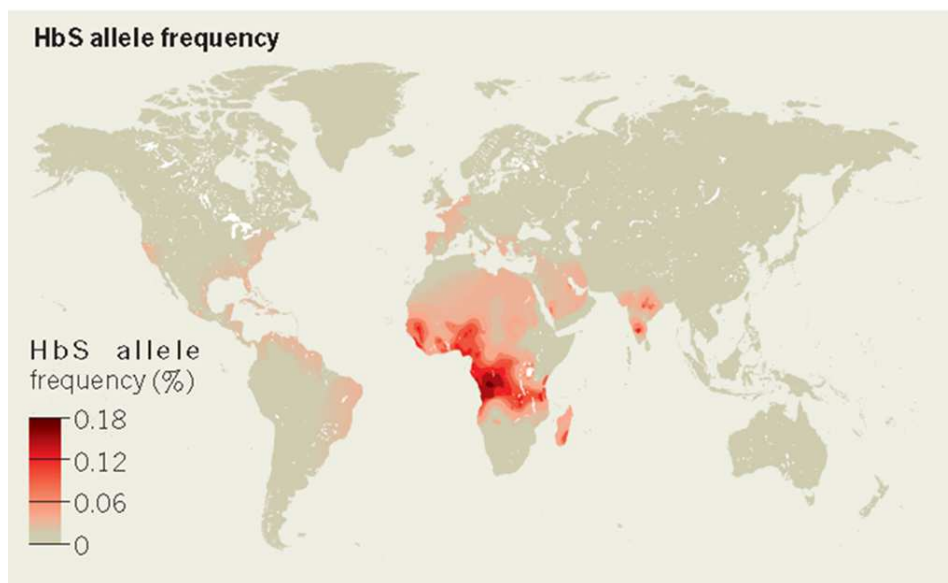


Figura 1: Distribuição global da frequência do alelo β^s , em que se observa o evidente predomínio da distribuição na África, região nordeste da América do Sul e Sudeste asiático (Pleasant, 2014).

No estado de Pernambuco, um em cada 23 recém-nascidos vivos possui o traço falciforme e um em cada 1400 nasce com a doença falciforme (Soares *et al.* 2014). Bandeira e cols.(Bandeira *et al.* 2008), ao realizar uma triagem em sangue de cordão

umbilical em uma amostra com alto percentual de indivíduos declarados afro-descendentes, encontraram uma frequência de 5,1% do traço falciforme em recém-nascidos acompanhados em uma maternidade pública no estado de Pernambuco.

2.1.2 Fisiopatologia

A AF, hemoglobinopatia autossômica recessiva, decorre de uma mutação pontual no gene da globina beta (*HBB*), localizado no cromossomo 11p15.15 (Driss *et al.* 2009; Ho & Thein 2000). Assim, a alteração molecular decorre de uma substituição de base no sexto códon do gene *HBB*, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina na 6ª posição da cadeia polipeptídica (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val). Essa mutação é suficiente para modificar a síntese da hemoglobina A normal (HbA), para a síntese de uma hemoglobina anormal, conhecida como hemoglobina S (HbS) (Steinberg & Sebastiani 2012).

Quando desoxigenadas, as moléculas de HbS estabelecem interações intermoleculares hidrofóbicas, que irão promover a sua polimerização, resultando em uma série de alterações morfológicas e funcionais dos eritrócitos, tornando-os falciformes (Sonati & Costa 2008). Esta falcização altera as propriedades da membrana celular, reduzindo sua flexibilidade e promovendo maior aderência ao endotélio vascular (Zhou *et al.* 2011).

A HbS demonstra propriedades bioquímicas peculiares, polimerizando-se quando desoxigenada. Estudos de cinética da polimerização da HbS demonstraram que a formação do polímero é de ordem exponencial em função da quantidade de hemoglobina, demonstrando o papel crucial da concentração de HbS no fenômeno da falcização (De *et al.* 2011)

A polimerização da HbS está associada com uma redução de água e íons celulares (desidratação), aumento da densidade do eritrócito, com consequente aceleração da formação do polímero. Estudos demonstraram que o eritrócito desidratado tem um papel fundamental nas complicações clínicas agudas e crônicas da AF, em que a falcização intravascular leva a uma vasoclusão, impedindo o fluxo sanguíneo (De *et al.* 2011; Kato *et al.* 2007)

As hemácias falcizadas também apresentam uma perda assimétrica de fosfolipídios de membrana, externando a fosfatidilserina (PS). Acredita-se que a PS tem um papel significativo na ativação da coagulação, além de promover a ativação dos macrófagos, sinalizando os eritrócitos a entrarem em *eritosis* (processo de destruição dos eritrócitos por fagocitose), via ligação à Anexina V. Assim, enquanto em indivíduos saudáveis são encontrados menos do que 1% de eritrócitos senescentes, em pacientes com AF essa taxa eleva-se para 30-40% (Gayen & Setty 2008; Kennedy 2015; Lang *et al.* 2012).

A polimerização das moléculas de HbS no interior das hemácias falcizadas promove-lhes lesão celular. Em larga escala, eritrócitos danificados promovem efeitos hemolíticos e vasoclusivos, caracterizando os fenótipos da AF (Steinberg 2008) (Figura 2).

Pacientes com DF, por desenvolverem hemácias falcizadas que apresentam um tempo de vida mais curto, cursam com um elevado grau de hemólise. Devido à hemólise crônica, estes pacientes apresentam altos níveis de hemoglobina plasmática que, por sua vez, sequestram o óxido nítrico, diminuindo sua disponibilidade, contribuindo também com o desenvolvimento das complicações clínicas da doença (Ngo & Steinberg 2014).

Na AF, a hemólise ocorre extra vascularmente pelo reconhecimento das hemácias danificadas por células do sistema reticulo endotelial. Por outro lado, a hemólise também

ocorre dentro dos vasos, com níveis que atingem até 30% da hemólise total de um paciente com AF (Steinberg & Sebastiani 2012).

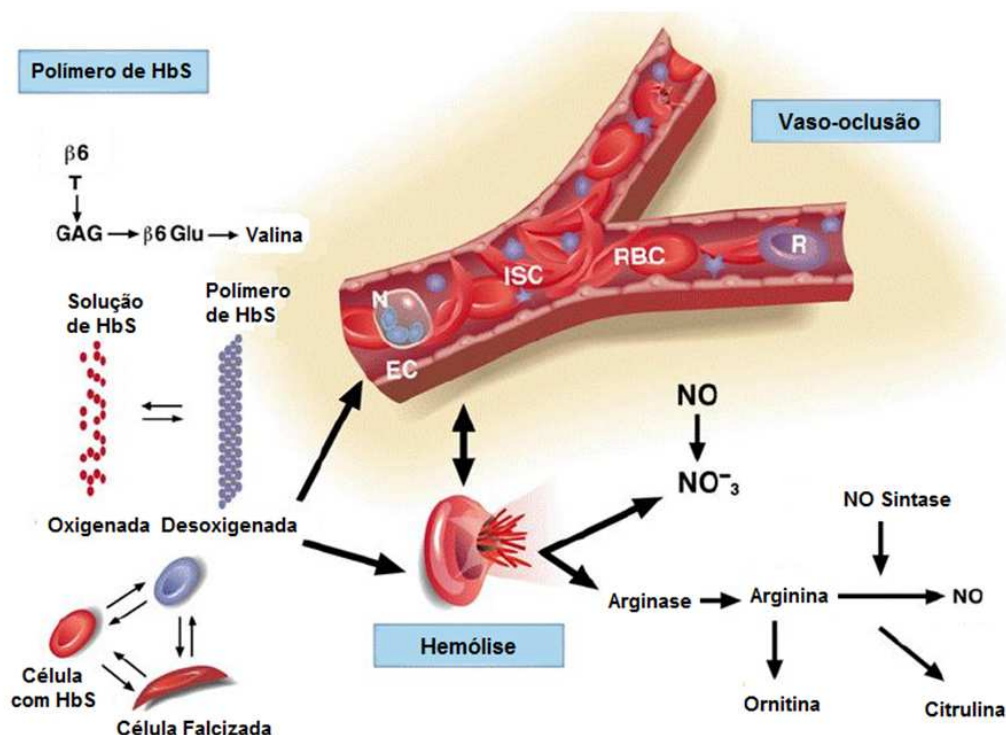


Figura 2: Fisiopatologia da anemia falciforme. Muta  o na 6   pos  o no gene da globina β , levando   forma  o de uma hemoglobina an  mala, a HbS, que sofre polimeriza  o quando desoxigenada. O polímero de HbS danifica o eritrócito, diminui sua vida útil (hemólise) e aumenta o consumo de óxido nítrico. As hemácias falcizadas também contribuem para vasocclus  o (Steinberg 2008).

Os eventos vasoclusivos na microcircula  o resultam de um cenário complexo e parcialmente descrito, que envolve intera  es entre eritrócitos falcizados e outros componentes do sistema circulatório (proteínas da coagula  o, endotélio, leucócitos e plaquetas) (Conran *et al.* 2009; Lanaro *et al.* 2009; Platt 2008)

A ocorrência de vasocclus  es, principalmente em pequenos vasos, juntamente com a hemólise, compõe um conjunto de eventos fisiopatológicos determinantes da grande maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes com AF (Ngo & Steinberg 2014).

Além disto, pacientes com DF têm mostrado uma intensa ativa  o da coagula  o sang  nea, com aumento da atividade plaquetária e consumo dos inibidores da coagula  o, caracterizando um estado de hipercoagulabilidade, especialmente durante as

crises vasclusivas (Colella *et al.* 2015). Complicações vasculares são aspectos importantes no espectro clínico da AF, no entanto existem evidências controversas sobre o papel da trombose nesses casos (Nishank *et al.* 2013). Contudo, no que concerne à literatura, estudos mostraram que grupos distintos de pacientes com AF apresentam hipoativação do sistema fibrinolítico, tendo assim, um risco aumentado para complicações tromboembólicas (Ataga *et al.* 2012; Lim *et al.* 2013).

2.1.3 Complicações clínicas

Apesar da AF ser causada por uma única mutação, esta doença é caracterizada pelo surgimento de fenótipos específicos a cada indivíduo acometido, variando latitudinalmente em frequência e gravidade e longitudinalmente quanto a duração (Manci *et al.* 2003). No cenário atual, a presença de critérios diagnósticos específicos e de estudos clínicos em populações representativas de um “cenário de vida real” ainda são um grande fator limitante no avanço da ciência aplicada (Iughetti *et al.* 2016). Deste modo, em 2005 o CSCCD (Centro de compreensão sobre a doença falciforme) do Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue (NHLBI) propôs uma nova categorização das complicações clínicas da AF, dividindo-as em 12 categorias, classificadas de acordo com o sistema e/ou órgão acometido, contidas em 3 grandes grupos maiores (Ballas *et al.* 2012).

Os três grandes grupos de complicações clínicas da AF são: 1) Anemia hemolítica e sequelas; 2) Síndromes de dor e eventos relacionados e 3) Complicações que afetam órgãos maiores e suas sequelas (Ballas *et al.* 2010); uma visão sumária das complicações presentes nestes grupos pode ser encontrada na tabela 1.

Tabela 1. Categorização das principais complicações clínicas apresentadas pelos pacientes com doença falciforme.

Grupo 1. Complicações hematológicas e suas sequelas

Exacerbação aguda da anemia

Hiperhemólise

Sequestro esplênico agudo

Crise aplásica

Complicações relacionadas com transfusões

Síndrome de hiperviscosidade

Hemólise imuno-mediada

Hemossiderose transfusional

Grupo 2. Síndromes de dor da doença falciforme e complicações correlatas

Síndromes de dor

Episódios de vaso-oclusão

Falência aguda de múltiplos órgãos

Síndromes de dor iatrogênica

Neuropatia (Dor neuropática)

Grupo 3. Complicações que afetam órgãos maiores

Complicações neurológicas

Acidente vascular cerebral (AVC) – Isquêmico ou hemorrágico

Aneurisma

Síndrome Moya-Moya

Infarto cerebral silencioso

Velocidade elevada no *Doppler* transcraniano (DTC)

Ataque isquêmico transitório

Complicações oftalmológicas

Glaucoma

Retinopatia proliferativa

Deslocamento de retina

Hifema

Complicações cardíacas

Cardiomegalia

Cardiomiopatia

Insuficiência cardíaca congestiva

Prolapso de válvula mitral

Hipertensão arterial sistêmica

Complicações pulmonares

Síndrome torácica aguda

Hipertensão pulmonar

Complicações gastrointestinais/ hepatobiliares

Colecistite

Colelitíase/ Lâmina biliar

Sequestro hepático

Colestase intra-hepática

Hepatite viral

Complicações renais/ geniturinárias

Falência renal aguda

- Insuficiência renal crônica
- Hematúria
- Priapismo
- Síndrome nefrótica acompanhada de proteinúria
- Pielonefrite
- Complicações esplênicas
 - Infarto esplênico agudo
 - Asplenia funcional
 - Hiperesplênismo
 - Sequestro esplênico agudo
- Complicações musculares/ esqueléticas/ cutâneas
 - Osteonecrose ou necrose avascular
 - Dactilite ou Síndrome de mão-pé
 - Úlceras de perna
 - Miosite/ Mionecrose/ Fascilite
 - Osteomielite
 - Osteopenia/ Osteoporose
- Distúrbios do crescimento e desenvolvimento
 - Retardo do crescimento

Complicações clínicas presentes nos grupos 1 e 2 são habitualmente de cunho agudo, comprometendo de um modo drástico e fugaz os pacientes com AF, levando os pacientes acometidos a necessitarem de acompanhamento imediato, devido a sua elevada taxa de mortalidade (Cajado *et al.* 2011).

Contudo, a perda da homeostase conduz a eventos crônicos com pronunciado impacto na qualidade de vida dos pacientes com AF, alguns ocorrendo com maior frequência e mais precocemente durante a vida dos indivíduos afetados e, outros mais tardiamente, com evolução crônica (Connes *et al.* 2014). Assim, dentre as principais complicações clínicas crônicas, que contribuem para a morbidade na doença, temos: complicações neurológicas, dentre elas o acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA), priapismo, úlceras de perna e a osteonecrose (Driss *et al.* 2009; Kato *et al.* 2007; Platt 2008).

2.1.3.1 Complicações crônicas da anemia falciforme

O AVC, é definido como uma síndrome neurológica aguda, secundária a oclusão de uma artéria ou hemorragia, resultando com isso em isquemia focal acompanhada de sinais e sintomas neurológicos (Belisario *et al.* 2015). Apresenta-se como a manifestação clínica mais grave da AF, sendo responsável por cerca de 20% da mortalidade entre adultos e crianças, bem como acarretar graves sequelas aos acometidos (Hoppe *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2011). O uso da ferramenta diagnóstica do Doppler transcraniano (DTC), levou a uma redução significativa na incidência de AVC em crianças, por promover o diagnóstico e intervenção precoce de indivíduos com alterações no fluxo vascular cerebral (Adams *et al.* 1998a). Contudo, mesmo com sua introdução no início dos anos 1990, após validação em estudos seriados, a exemplo do estudo prospectivo multicêntrico randomizado de fase III - o ensaio *STOP* (Ensaio de prevenção para o AVC na anemia falciforme), a busca por novos marcadores que auxiliem na predição do AVC ainda é de grande necessidade (Domingos *et al.* 2014).

Seguida do AVC, a síndrome torácica aguda (STA) representa a segunda causa mais comum de hospitalização dos pacientes com AF, inferior somente às crises vasclusivas comuns (Gladwin *et al.* 2011). O termo STA reflete a dificuldade em distinguir as infecções pulmonares (comumente a pneumonia viral ou bacteriana) de outras condições que ocorrem na doença falciforme, como as mudanças inflamatórias decorrentes da embolia gordurosa ou infarto pulmonar por oclusão da microvasculatura, diagnosticado a partir do raio-X de tórax evidenciando o expressivo infiltrado pulmonar (Maitre *et al.* 2000). Vichinsky e colaboradores (1997) (Vichinsky *et al.* 1997), em um estudo cooperativo com 3.751 pacientes com AF nos Estados Unidos, encontraram uma frequência de 12.8 episódios para cada 100 pacientes/ano, sendo a STA considerada uma das principais causas de morte prematura na AF, totalizando 25% das causas de

óbito. Isso pode ser explicado pelo processo de alça de retroalimentação, caracterizado por uma diminuição da saturação de oxigênio, aumentando a fração de HbS polimerizada com subsequente efeito deletério no fluxo sanguíneo e função pulmonar (Castro *et al.* 1994; Vichinsky *et al.* 1997).

O priapismo, caracterizado como condição patológica em que ocorre ereção peniana sem estímulo sexual ou desejo, possui incidência de 1.5 casos por 100,000 indivíduos/ano na população em geral (Morrison & Burnett 2011). Dentre os tipos desta complicação, a forma isquêmica surge associada a complicações devastadoras, incluindo necrose do tecido erétil e fibrose (Montague *et al.* 2003). Nos pacientes com DF, a forma isquêmica tem uma prevalência de 27,5 - 42% (Montague & Angermeier 2006). Anele e cols (Anele *et al.* 2015) sugerem que até 89% dos pacientes com AF do sexo masculino terão esta manifestação até os 20 anos de idade (embora um grande percentual dos pacientes não relate o evento ao corpo clínico), sendo caracterizada como a complicação renal/geniturinária mais comum em indivíduos AF do sexo masculino.

As úlceras de perna são as manifestações cutâneas/musculoesqueléticas mais comuns da AF. Diversos trabalhos apontam que até 70% dos pacientes com AF desenvolverão esta complicação até os 30 anos de idade (Delaney *et al.* 2013). A fisiopatologia desta complicação permanece desconhecida, sendo muitas vezes refratárias ao tratamento com hidroxiuréia (HU) (Connes *et al.* 2013). Devido à grande extensão que estas lesões podem adquirir, além da difícil cicatrização e à colonização delas por micro-organismos que comprometem ainda mais a lesão, esta complicação traz consigo importantes consequências fisiológicas e psicossociais (Powars *et al.* 2005).

Além das complicações supracitadas, os pacientes com AF desenvolvem diversas complicações ósseas, como a osteomielite, osteopenia/osteoporose e a osteonecrose ou necrose avascular, sendo esta última a que mais compromete a qualidade de vida dos

pacientes acometidos (Picot *et al.* 2014). Assim, a osteonecrose, caracterizada como um infarto das superfícies articulares com consequente degeneração e destruição da cartilagem articular, constitui uma importante causa de morbidade na AF; contudo, sua patogênese segue desconhecida (Lemonne *et al.* 2013). Comumente, esta complicação apresenta um diagnóstico tardio, quando os pacientes já apresentam limitação na locomoção, restando apenas, como tratamento, o tratamento de analgesia paliativa ou uma intervenção cirúrgica que, na maioria dos casos, apresenta resultados insatisfatórios (Marsh *et al.* 2015; Milner *et al.* 1991).

As alterações clínicas podem ocorrer na maioria dos pacientes, porém são inúmeras as variações no fenótipo na doença. Assim alguns indivíduos seguem com curso clínico mais grave e de alto risco com os primeiros sinais e sintomas ocorrendo logo após o nascimento, enquanto outros se tornarão sintomáticos mais tarde ou raramente apresentarão intercorrências clínicas que necessitem de hospitalização (Sebastiani *et al.* 2005). A baixa prevalência da doença falciforme em países desenvolvidos é um dos fatores limitantes do progresso no conhecimento a respeito da pesquisa clínica, básica e translacional (Ballas *et al.* 2010). Assim, o conhecimento pleno a respeito das complicações clínicas facilitaria no desenho de estudos de associação do tipo genótipo-fenótipo, contribuindo para o entendimento a respeito da fisiopatologia das complicações clínicas.

Deste modo, além do principal evento na fisiopatologia da doença, a polimerização das moléculas de HbS, outros mecanismos fisiológicos têm sido importantes fatores na determinação da frequência das complicações (Steinberg 2005). Tais fatores compreendem desde alterações estruturais e funcionais da membrana eritrocitária e níveis de Hb fetal, até marcadores moleculares, que podem ser divididos em clássicos (co-hereditariedade com a talassemia alfa e haplótipos β^s) e emergentes, como os

polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) em genes relacionados com a fisiopatologia das complicações da doença e mais recentemente, os reguladores epigenéticos (Bhatnagar *et al.* 2013; Costa *et al.* 2015; Powars 1991).

2.2 MARCADORES MOLECULARES

2.2.1 Haplótipos do gene da globina β^S

Padrões de sítios polimórficos do DNA ligados ao complexo da β -globina definem os chamados haplótipos da anemia falciforme (Alsultan *et al.* 2014). Segundo Sutton e cols (Sutton *et al.* 1989) a mesma mutação β^S apareceu independentemente em pelo menos cinco diferentes grupos populacionais, sendo os haplótipos denominados de acordo com as regiões de maior prevalência (Sutton *et al.* 1989). Outra teoria postula que os haplótipos ligados ao *cluster* β^S teriam surgido por conversão gênica regulada por fatores epigenéticos, tornando o surgimento dos mesmos bastante controverso (Patrinos *et al.* 2005; Romana *et al.* 2000).

Assim até o momento, foram descritos cinco diferentes haplótipos da globina β^S . Os haplótipos são designados de Benin (BEN), Bantu ou República Central Africana (BAN ou CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-Indiano ou Saudi-Árabe (ARB ou SAU) (Rusanova *et al.* 2011).

Os haplótipos β^S parecem estar associados com o prognóstico dos pacientes com AF, por apresentarem correlação com os níveis de hemoglobina fetal (HbF), visto que, estudos de geleificação de hemoglobina mostraram que a presença da HbF diminui a capacidade de polimerização da HbS (Steinberg *et al.* 1995). Pacientes com AF e haplótipos SEN ou ARB apresentam níveis elevados de HbF (>15%), desenvolvendo assim uma forma clínica mais branda da doença, devido ao polimorfismo na posição -158

(C→T) no gene *HBG2*, associado com o aumento da expressão da globina γ^G (Thein 2013). Já pacientes que apresentam haplótipo CAR (ou Bantu) desenvolvem um curso clínico adverso, por cursarem com níveis diminuídos de HbF (<5%). Pacientes que possuem o haplótipo BEN em homozigose apresentam quadros clínicos intermediários (Cajado *et al.* 2011; Rahgozar *et al.* 2000; Steinberg 2005).

Estudos de diferentes grupos étnicos com AF, com características hematológicas distintas, sugerem que o haplótipo da globina β pode ser utilizado com um marcador de gravidade da doença, onde estudos em pacientes de mesmo haplótipo podem ajudar a elucidar a real contribuição de outras variáveis genéticas (Domingos *et al.* 2014; Steinberg 2005).

2.2.2 Talassemia alfa (α)

A talassemia alfa (α) é caracterizada como uma diminuição ou ausência de síntese das cadeias globínicas alfa (α) da molécula de hemoglobina, podendo ser decorrente de deleções ou mutações pontuais nos genes α^1 e /ou α^2 . A talassemia α^1 ou α^0 é caracterizada pela perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha\alpha$) e, a talassemia α^2 ou α^+ é representada pela perda de um dos genes α em pelo menos um dos cromossomos ($-\alpha/\alpha\alpha$) (Higgs 2013). Dentre as causas de talassemia alfa, a α^2 mostra-se como mais frequente, apresentando dois tipos de deleções, a de 3.7Kb e de 4.2Kb (Dode *et al.* 1993).

A co-herança da talassemia alfa (α) com a AF tem como consequência a redução do volume corpuscular médio (VCM), um menor número de reticulócitos e menor grau de hemólise, devido a redução da hemoglobina corpuscular média (HCM), conferindo assim uma melhora nos parâmetros hematológicos da doença (Hassan *et al.* 2014). Entretanto, os benefícios acarretados por esta co-herança, sobretudo na redução da concentração de

hemoglobina intracelular (incluindo as moléculas de HbS), ainda não estão completamente estabelecidos. Deste modo, por diminuir a hemólise, a associação da talassemia alfa (α) com a AF protege contra os fenótipos associados com processos hemolíticos, como as úlceras de perna, priapismo e AVC (Domingos *et al.* 2014; Silva *et al.* 2015). Entretanto, alguns estudos apontam para uma maior frequência de episódios dolorosos, decorrente de um aumento da viscosidade sanguínea, devido uma elevação no percentual de eritrócitos circulantes, como uma compensação fisiológica inerente a esta condição (Kato *et al.* 2007; Sankaran & Weiss 2015).

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

2.3 ANEXINA A2

Anexinas são proteínas caracterizadas por possuírem repetidos domínios com a habilidade de se ligarem a fosfolipídios de membrana carregados negativamente, com função dependente de cálcio (Creutz 1992). Entretanto as vias fisiológicas desempenhadas por estas moléculas ainda permanecem, em parte, desconhecidas, mas sabe-se que estas moléculas participam dos processos ligados ao transporte e comunicação via membrana plasmática, como a endo e exocitose, fusão membranar, interações membrana/citoesqueleto e regulação de canais cálcio-dependentes (Faure *et al.* 2002; van de Graaf *et al.* 2003)

O gene *ANXA2*, constituído por 17 éxons distribuídos ao longo de 40Kb de DNA genômico no cromossomo 15 (15q22.2) codifica a proteína Anexina A2 (Anx2), uma proteína com 339 aminoácidos e 38,6 kDa encontrada em células endoteliais, células mononucleares, precursores ósseos e células tumorais metastáticas (Hedhli *et al.* 2012)

A Anx2 pode ser encontrada na forma citoplasmática livre, bem como ligada a fosfolipídios de membrana, onde desempenha papel no metabolismo ósseo, regulando o balanço entre a osteogênese e a reabsorção óssea, na regulação do crescimento celular e transdução de sinal, sobretudo no tecido endotelial e no processo de coagulação sanguínea, respectivamente (Flood & Hajjar 2011).

Implicada na organização e dinâmica de *rafts* membranares, caracterizadas como regiões transientes de 10 – 300 nm constituídos por microdomínios ricos em colesterol com elevada dinâmica de constituição, estando presente em alguns tipos celulares (Galbiati *et al.* 2001). Anx2 atua ligando os fosfolipídios de membrana a filamentos de actina no citoesqueleto, assegurando assim a manutenção dos *rafts* lipídicos (Gerke & Moss 2002). Funcionalmente, estes *rafts* lipídicos atuam como plataformas de recrutamento para complexos proteicos envolvidos em cascatas de sinalização celular e em vias de secreção e endocitose de partículas (Cherukuri *et al.* 2001).

No que concerne à literatura, o estudo de Chasserot-Golaz e cols. (2005) (Chasserot-Golaz *et al.* 2005) envolvendo genes diferencialmente expressos em células de osteosarcoma, revelaram o gene *ANXA2* como um dos principais responsáveis pela mineralização dos osteoblastos malignos. Durante o processo de mineralização óssea, os osteoblastos desempenham um importante papel na produção e secreção dos componentes do osteóide (colágeno tipo I e substância fundamental), matriz extracelular e proteínas necessárias para a mineralização, com destaque para a fosfatase alcalina (FA) (Gillette *et al.* 2004; Gillette & Nielsen-Preiss 2004). A FA desempenha um importante papel na formação e mineralização óssea, regulando negativamente a perda de íons cálcio-fosfato. A Anx2 tem sido descrita como um receptor de superfície celular para componentes da matriz extracelular, tendo Genetos e cols demonstrado a Anx2 presente nos osteoblastos, localizada nos *rafts* lipídicos. Os mesmos autores, ao promoverem a

superexpressão de *ANXA2* evidenciaram uma acentuação na mineralização óssea, via aumento na atividade da FA (Genetos *et al.* 2014; Gillette *et al.* 2004).

Recentemente a Anexina A2 foi correlacionada com a regulação do processo de divisão celular, via regulação do anel citocinético (Benaud *et al.* 2015). A ausência de Anx2 conduz a uma disfunção no arranjo dos filamentos de actina, diminuindo sua polimerização, juntamente com a dos microtúbulos do citoesqueleto, levando a uma perda de organização espacial dos componentes celulares que culmina em falha no processo de divisão celular (Benaud & Prigent 2016). Ademais, a ausência de Anx2 conduz a uma falha nos estágios iniciais de formação do anel citocinético, comprometendo o processo como um todo. Isto aponta que Anx2 atua em elementos regulatórios do processo, contudo, estudos posteriores são necessários para validar essa hipótese (Benaud *et al.* 2015).

Em sua forma citoplasmática a Anx2 existe sob a forma monomérica solúvel que na presença de proteínas acessórias, como a p11 (um membro da família de proteínas S100 (S100A10)) formam um complexo membranar estável, composto por duas subunidades de Anx2 e p11 (A2-p11) (Bharadwaj *et al.* 2013).

Assim, sabe-se que o complexo Anx2-p11 desempenha um papel chave na regulação dos processos hemostáticos na superfície das células endoteliais, coordenando o processo de dissolução da fibrina (Chasserot-Golaz *et al.* 2005). O complexo A2-p11 fornece uma superfície necessária para a formação de plasmina (principal enzima fibrinolítica), a partir da conversão do plasminogênio (Plg) via ativador tecidual do plasminogênio (tPA) (Flood & Hajjar 2011) (Figura 3).

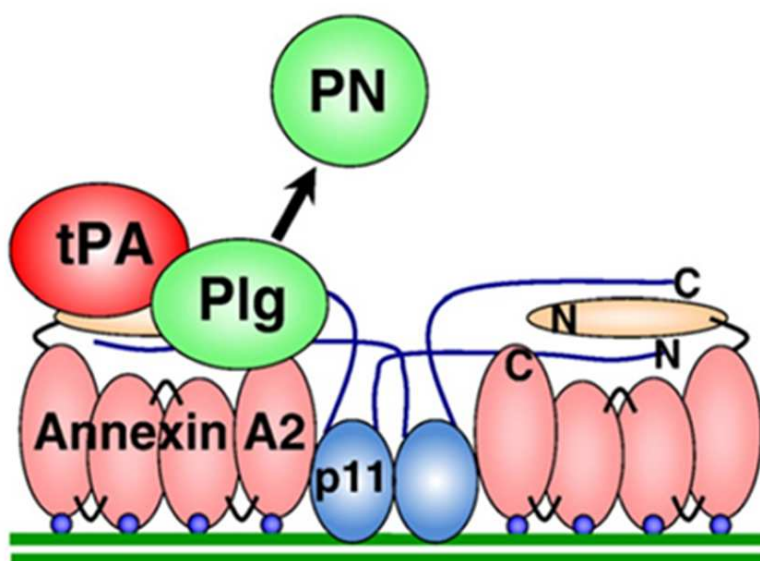


Figura 3. Sistema A2-p11 na superfície das células endoteliais. O heterotetrâmero é composto por duas subunidades de p11 e duas de Anx2. Anx2 é constituído por quatro domínios centrais (rosa) e uma cauda N-terminal (amarelo). O heterotetrâmero liga o plasminogênio (Plg) e o ativador tecidual do plasminogênio (tPA), acelerando assim a geração de plasmina (PN) (Flood & Hajjar 2011).

Deste modo, o complexo A2-p11, aumenta a atividade catalítica do tPA na conversão do plasminogênio em 60 vezes (Fan *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2010). Ling e cols (2004), estudando o papel fisiológico da Anx2 em camundongos nocauteados para *ANXA2* (*Anxa2*^{-/-}), demonstraram uma deposição de fibrina no interior da microvasculatura destes animais, sendo os mesmos, mais propensos ao desenvolvimento de trombos quando comparados com os animais saudáveis (*Anxa2*^{+/+}). Além disto, animais *Anxa2*^{-/-} também exibiram uma neovascularização deficiente, sem razão até o momento descrita (Ling *et al.* 2004).

Desse modo, Jacob Rand (Rand 1999) propôs o termo “Anexinopatias” para classificar um novo conjunto de doenças que tem membros da família das anexinas, atuando de modo desregulado na fisiopatologia das complicações.

A primeira doença que teve sua fisiopatologia ligada a uma desregulação molecular da Anx2 foi a leucemia promielocítica aguda (LPA), processo descrito por Menell e cols (Menell *et al.* 1999). Os autores demonstraram que os blastos leucêmicos da LPA

expressavam altos níveis de Anx2, levando a uma fibrinólise exacerbada nestes pacientes, contribuindo assim para os eventos hemorrágicos nesta doença. Assim, diversos trabalhos tem apontado a Anx2 como um alvo promissor na elucidação das bases moleculares implicadas no surgimento das diversas complicações clínicas da AF.

2.3.1 Polimorfismos no gene da Anexina A2 (ANXA2)

Uma análise recente de 108 SNP's em 39 genes candidatos revelou variações em *ANXA2*, que dentre outros, mostrou-se associado a um maior risco de AVC em pacientes com AF (Sebastiani *et al.* 2005). Um segundo estudo independente, relacionou SNPS em *ANXA2* com um aumento no risco de AVC em crianças com doença falciforme (DF) (Flanagan *et al.* 2011), e adicionalmente, polimorfismos em *ANXA2* foram associados com o surgimento de osteonecrose na AF (Baldwin *et al.* 2005). Estes resultados sugerem que a Anx2 pode atuar como um modificador expressivo das formas de expressão clínica da AF, bem como de seu curso natural (Hedhli *et al.* 2012).

Assim, diversos polimorfismos no gene *ANXA2* já foram descritos, podendo levar a uma redução nos níveis de expressão, por modularem a ligação dos fatores de transcrição e/ou acentuadores aos seus sítios específicos (Baldwin *et al.* 2005). Isso conduziria os indivíduos afetados a um estado de maior estase vascular, podendo estar associados com um risco aumentado a complicações trombóticas, como o AVC e acentuando o aparecimento de crises vasclusivas (CVO's) (Flanagan *et al.* 2011). Além disto, devido ao seu importante papel no metabolismo ósseo, baixos níveis de Anx2 nos osteoblastos podem acarretar uma maior fragilidade óssea nos indivíduos acometidos, e, assim, uma maior predisposição a complicações osteoarticulares, como a osteonecrose (Baldwin *et al.* 2005). Adiante, dois grupos distintos, o de Baldwin e cols. (2005) e Pandey e cols (2012), encontraram associação entre os polimorfismos *ANXA2**5681 G→A

(rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836), dentre outros SNPs em *ANXA2*, com o desenvolvimento de osteonecrose na AF (Baldwin *et al.* 2005; Pandey *et al.* 2012b).

O polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), uma transição localizada na região intergênica à 3' do gene *ANXA2*, tem seu suposto papel relacionado com o dobramento de alças na cromatina, influenciando na ligação de fatores de acentuação à região promotora do gene *ANXA2*, podendo atuar como um regulador dos níveis de expressão deste gene (Baldwin *et al.* 2005). O IVS-14-1046 C→T (rs7163836), embora localizado em uma região de junção íntron-éxon do éxon 15, ainda não foi correlacionado com nenhuma mudança estrutural na proteína Anx2 ou formação de um transcrito não-funcional (Sebastiani *et al.* 2005). Entretanto, é importante destacar que os polimorfismos *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836) são polimorfismos do tipo *Tag*-SNPs (Stram 2004) ,apresentando uma frequência do alelo polimórfico na população geral de 63% e 47%, respectivamente (Projeto 1000 genomas, Fase III) (Abecasis *et al.* 2012). Isto implica que a presença destes polimorfismos possa indicar uma possível desregulação molecular do gene *ANXA2*, que pode ser decorrente até mesmo pela presença de outros SNPs em *ANXA2* flanqueados pelos *Tag*-SNPs supracitados, sem necessariamente decorrer da alteração molecular promovida pelos *Tag*-SNP's (Stram 2004). Isto reitera a necessidade de estudos de associação envolvendo polimorfismos deste tipo, que oferecem um maior espectro de informatividade a respeito do papel dos genes relacionados (de Azevedo *et al.* 2013). Deste modo, é teoricamente provável que indivíduos que possuam os polimorfismos *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836) apresentem um comprometimento molecular em *ANXA2* e assim, um risco elevado ao desenvolvimento de complicações clínicas na anemia falciforme.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a contribuição dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836) do gene *ANXA2* no desenvolvimento das complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme (Hb SS).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836) e investigar a sua associação com as principais manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme (Hb SS);
2. Avaliar os níveis de expressão do gene *ANXA2* em pacientes com anemia falciforme e correlacionar esses achados com os SNPs *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Nossa coorte foi constituída por 747 pacientes portadores de anemia falciforme (Hb SS), não aparentados, atendidos no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE (Recife – PE). Destes, 33 pacientes foram excluídos por apresentarem acompanhamento irregular e/ou perda de seguimento na fundação HEMOPE, restando ao final 714 pacientes, sendo 347 (48,6%) do sexo masculino. O tempo de segmento médio foi de 13 anos (intervalo: 0 a 34 anos), com mediana de idade de 25 anos (variação: 3 a 61 anos), sendo 194 pacientes (27,2%) com idade inferior a 18 anos, constituindo o grupo pediátrico e os demais (com idade igual ou superior a 18 anos) constituindo o grupo adulto. A mediana de idade do grupo pediátrico foi de 13 anos (variação: 3 a 17 anos) e a do grupo adulto foi 29 anos (variação: 18 a 61 anos). De acordo com as principais complicações clínicas crônicas, esses pacientes foram agrupados em oito grupos distintos, analisados de modo compartimentalizado, a saber:

- I) Grupo Colelitíase: Composto por 409 pacientes (57,2%) que apresentaram registro clínico e laboratorial, por meio de ultrassonografia, de cálculos biliares ou de lama biliar. Como grupo controle (n=188; 26,3%) foram utilizados pacientes sem relato da complicação supracitada, com idade atual superior a 18 anos;
- II) Grupo STA: Composto por 82 pacientes (11,4%) que apresentaram registro clínico de síndrome torácica aguda, acompanhada de exame de imagem (Raio-X) de tórax, mostrando a presença de infiltrado pulmonar, como proposto por Vichinsky e colaboradores, 1997 (Vichinsky *et al.* 1997);
- III) Grupo Úlcera de perna: Composto por 143 pacientes (20%) que apresentaram registro clínico, atual ou prévio, de úlceras de perna (agudas e crônicas),

decorrentes da falha do processo de reparação tecidual no local da lesão, como proposto por Minniti e colaboradores, 2010 (Minniti *et al.* 2010), relatados no prontuário;

- IV) Grupo Osteonecrose: Composto por 84 pacientes (11,7%) que apresentaram registro de ressonância magnética e/ou exame de raio-X mostrando lesão óssea, conforme proposto pelas diretrizes publicadas recentemente (2015) e que apresentaram evidentes manifestações e queixas clínicas decorrentes da osteonecrose, relatados no prontuário;
- V) Grupo Priapismo: Composto por 97 pacientes (13,5%) que apresentaram registro clínico atual ou prévio de priapismo, conforme proposto por Montague e colaboradores, 2003 (Montague *et al.* 2003), relatados no prontuário. Como grupo controle (n=46; 6,4%) foram utilizados os pacientes do sexo masculino contidos no grupo controle, citados abaixo.
- VI) Grupo AVC: Composto por 70 pacientes (9,8%) que apresentaram registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica e que apresentem evidentes manifestações e queixas clínicas decorrentes de acidente vascular cerebral, como comprometimento cognitivo, parestesia, comprometimento dos sentidos, dentre outros, relatados em prontuário. Além disto, foram excluídos os pacientes com AVC que apresentaram comorbidades importantes para esta complicação clínica (pacientes com hipertensão arterial sistêmica e cardiopatas) bem como pacientes que apresentaram outras complicações neurológicas concomitantemente (Epilepsia, crises convulsivas e/ou síndrome Moya-Moya);

- VII) Grupo Faixa de risco para AVC: Composto por 62 pacientes (8,6%) que apresentaram alteração na velocidade média máxima dos vasos cerebrais ($>170\text{cm/s}$) caracterizando indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento de complicações neurológicas, como o AVC, como proposto por Adams e colaboradores, 1998 (Adams *et al.* 1998b);
- VIII) Grupo Controle AF: Composto por 134 pacientes (18,7%) acima de 18 anos, que permaneceram vivos até a censura e que não apresentaram ao longo de seu segmento na Fundação HEMOPE nenhuma complicação clínica crônica, como proposto por Ballas e colaboradores, 2010 (Ballas *et al.* 2010) (STA, AVC, úlceras de perna, osteonecrose, Faixa de risco para AVC, priapismo) confirmada em prontuário pelos exames necessários. Além disso, foram excluídos desse grupo pacientes que apresentem outras complicações neurológicas ($n=75$; 10,5%) (como crises convulsivas recorrentes e síndrome Moya-Moya) e pacientes com suspeita de osteonecrose ($n=23$; 3%) não confirmada por exame de imagem e pacientes com relato dubio quanto a ausência de priapismo e úlceras de perna. Por fim, foram excluídos os pacientes que apresentaram comorbidades que comprometessem a homeostase vascular (hipertensão arterial sistêmica ($n=51$; 7%) e pulmonar ($n=12$; 1,7%), e cardiopatas ($n=59$; 8%).
- IX) Grupo de doadores saudáveis: Composto por 43 indivíduos saudáveis, acima de 18 anos de ambos os sexos, com perfil de hemoglobina normal do adulto (Hb AA) que não apresentaram infecções e inflamações num período prévio de 4 semanas a coleta.

É importante destacar que 241 pacientes (33,7%) apresentaram mais de uma complicação clínica crônica ao longo do segmento na fundação HEMOPE. Todos os

pacientes incluídos tiveram suas amostras coletadas quando os mesmos se encontravam em estado basal, de acordo com a criteriorização proposta por Ballas e cols. (2012) (Ballas *et al.* 2012) definida por: ausência de crises de dor e doenças intercorrentes, como infecções e inflamações num período prévio de 4 semanas; sem admissão hospitalar 3 dias antes da coleta e sem transfusões sanguíneas 4 meses antes da coleta. Os pacientes que não obedeceram aos critérios não tiveram sua amostra coletada. Em todos os pacientes foram analisados os perfis clínicos, laboratoriais e moleculares. A convocação dos pacientes foi realizada por telefone e telegrama. A cada convocação, ou durante as visitas de rotina ao hematologista, após assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), cerca de 8,0 ml de sangue periférico adicionais foram coletados em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. As amostras foram conduzidas para o laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a realização dos testes moleculares.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Estudo do tipo corte transversal analítico com comparação de grupos realizado de março/2014 a fevereiro/2016. O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco, onde foram realizados os testes moleculares, tendo a Fundação de Hematologia de Pernambuco (HEMOPE) como instituição coparticipante, onde foram coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE (Nº do parecer: 035/10) (Anexo I). Após a aprovação, 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 co-instituição, pois os pacientes foram obtidos da mesma.

Os pacientes, após entrevista, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I), previamente aprovado pelo CEP.

4.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA

As análises dos dados hematológicos foram realizadas utilizando contador eletrônico de células (STKS, Coulter Corporation, FL, USA). A quantificação das hemoglobinas fetal (HbF) e S foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA). Para os doadores saudáveis foi realizada a avaliação do perfil de hemoglobina por eletroforese alcalina (pH 8,6) em suporte sólido, além de hemograma e estudo do ferro, a fim de excluir indivíduos com outras doenças hematológicas (como traço talassêmico α e/ou β , além de anemias carenciais). Os dados clínicos foram obtidos pela análise de prontuários dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE.

4.5 ANÁLISE MOLECULAR

4.5.1 Extração do DNA genômico e avaliação dos marcadores moleculares clássicos

A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos contidos em 4,0 ml de amostras de sangue total colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante, pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Psifidi *et al.* 2015). Sumariamente, a amostra de sangue total foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos, onde o plasma foi descartado e os eritrócitos lisados incubando-os por 15 minutos em solução de lise de eritrócitos (0,144 mol/l NH_4Cl , 0,01 mol/l NH_4HCO_3), com posterior centrifugação, descartando o sobrenadante. A seguir, adicionou-se o tampão TKM1 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20mM) ao precipitado juntamente com 50 μl de Triton X-100, homogeneizando vigorosamente as amostras, com posterior centrifugação a 2.300 rpm por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado, obtendo-se o precipitado de leucócitos.

Para lise dos leucócitos, foram adicionados 400 μl do tampão TKM2 (Tris-HCl 10mM pH7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25 μl de SDS 10%, incubando à 55°C durante 45 minutos. Após esse período, 180 μl de NaCl 5M foram adicionados à solução anterior com repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 14.000 rcf por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se a ele, um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico, conhecida por Sevag (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. O Sevag foi adicionado ao tubo, centrifugado e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foram adicionados acetato de sódio 3M pH 5,3 e etanol absoluto gelado

para precipitação do DNA, sendo então novamente centrifugado a 14.000 rcf por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada e estéril, quantificado em equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa realizada em gel de agarose 1,0%.

Os haplótipos do gene β^S foram determinados por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de análise de restrição (RFLP), sendo analisados 6 sítios polimórficos para definir os haplótipos: 5' γ^G -*Xmn* I, γ^G -*Hind* III, γ^A -*Hind* III, $\psi\beta$ -*Hinc* II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc* II e 5' β -*Hinf* I (Bezerra *et al.* 2007) utilizando o conjunto de *primers* disponível na tabela 2.

Tabela 2. *Primers* utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β : localização referente ao *cluster* β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

Primers	Seqüência do Primer	Direção	Posição	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	S	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	AS	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	S	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	AS	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	S	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	AS	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	S	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	AS	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	S	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	AS	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	S	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	AS	61291	
S = Sense; AS = Anti-sense.				

A composição das reações e condições de amplificação variaram dependendo do resultado e estão representadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Componentes	Volumes (μ l)					
	<i>Xmn</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Hinc</i> II	<i>Hinc</i> II	<i>Hinf</i> I
	5' γ^G	γ^G	γ^G	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β
Tampão (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MgCl ₂ (50mM)	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
dNTP's (10mM)	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Primer 5' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 3' (10 μ M)	1,25	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq DNA Polimerase (5U/ μ l)	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
dH ₂ O	37,75	38,0	38,0	38,0	38,0	38,25
Volume Final (μl)	50	50	50	50	50	50

Para confirmação da amplificação o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (UV), com posterior análise de restrição.

Tabela 4. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Região	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento 35 ciclos		Extensão		Extensão Final	
	T	Tempo	T	Tempo	T	Tempo	T	Tempo	T	Tempo
	(°C)		(°C)		(°C)		(°C)		(°C)	o
5' γ^G	94	5'	94	45"	60	45"	72	1'30"	72	7'
γ^G	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
$\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30"	55	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	5'	94	45"	57	45"	72	1'30"	72	7'

Para a análise de restrição, o produto da PCR foi digerido a 37°C durante 24 horas com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em

gel de agarose de 1,0% a 1,5% (a depender do tamanho dos fragmentos) corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz UV.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. Como controle foi utilizado à amostra de um indivíduo heterozigoto para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Primers	Enzima	Região	Tamanho Fragmento	Fragmentos Após Clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5'γ ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	ψβ	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3'ψβ	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf</i> I	5'β	380 pb	240 pb + 140 pb

Pacientes que apresentarem padrão de restrição diferentes do perfil pré-determinado na literatura tem seu haplótipo considerado “Atípico”.

A pesquisa da mutação $\alpha_2^{3,7Kb}$ foi investigada por *gap*-PCR, utilizando-se os iniciadores C2 e C10, onde os oligonucleotídeos iniciadores se ligam na região que compreende a possível deleção, gerando padrões distintos de produtos de amplificação, conforme previamente descrito (Dode *et al.* 1993).

Sumariamente, na pesquisa da ($-\alpha^{3,7Kb}$), o produto amplificado gera um fragmento de 2,1kb para o haplótipo normal ($\alpha\alpha$) e de 1,9kb para o haplótipo mutante ($-\alpha^{3,7Kb}$). Foi utilizada a seguinte reação de PCR: 1,0 µl de DNA (250ng); 2,5 µl de tampão α^* ; 2,5 µl de DMSO; 0,75µl de dNTP 10mM; 0,5 µl de cada *primer* 10µM (Tabela 6); 0,25µl de taq polimerase 5U/µl, em um volume final de 25,0 µl de água. Condições de ciclagem:

desnaturação inicial 94°C - 10'; 30 ciclos: 94°C - 45"; 56°C - 1' e 72°C - 1'; extensão final 72°C - 7'.

Tabela 6. Seqüências dos *primers* para pesquisa da deleção $\alpha^{3,7Kb}$. Localização referente ao gene α no cromossomo 16 depositados no banco de dados NCBI (ID: J00153).

Primers	Seqüência do Primer (5'-3')	Direção	Posição
C2	CCATGCTGGCACGTTTCTGA	AS	11365
C10	GATGCACCCACTGGACTCCT	S	5641
S = Sense; AS = Anti-sense.			

*Tampão alfa (α) para PCR - Soluções estoque: 3,35 ml de Tris-HCl 2M (pH 8,6); 1,66 ml de $(NH_4)_2SO_4$ 1M; 250 μ l de $MgCl_2$ 1M; 33,5 μ l de Na_2EDTA 0,2M; 85 μ l de BSA-20 mg/ml; 70 μ l de β -mercaptoetanol 14,3M, para um volume final de 10 ml com dH_2O . Todas as soluções estoque foram autoclavadas, exceto $MgCl_2$ que é filtrada.

4.5.2 Análise dos polimorfismos do gene *ANXA2*

A detecção dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) e IVS-14-1046 C→T (rs7163836) foi realizada por PCR em tempo real (RT-PCR) por discriminação alélica utilizando o sistema *TaqMan®*, que consiste de 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_11770325_10 e C_9036149_10). Para realização desta técnica foi utilizado o aparelho Rotor Gene 6000TM (Corbett Research, Austrália).

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). Todos estes procedimentos foram realizados utilizando-se a infraestrutura do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.5.3 Extração do RNA a partir de leucócitos totais e síntese do DNA complementar (cDNA)

O isolamento do RNA para os ensaios de expressão gênica procedeu-se a partir de 4,0 ml de amostras de sangue total colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram pareadas por sexo, idade, háplotipo β^S (todos CAR/CAR) e com genótipo alfa normal. Para tal, as amostras selecionadas (n=70; 29 homens (41%)) foram centrifugadas a 1.300 rcf por 10 minutos a 4°C para remoção do plasma. Os eritrócitos foram lisados a partir de incubação por 15 minutos no gelo com solução de lise de eritrócitos gelada (0.144 mol/l NH_4Cl , 0.01 mol/l NH_4HCO_3) e após a incubação foram centrifugadas a 1.300 rcf por 10 minutos a 4°C. O *pellet* remanescente foi lavado com solução tampão fosfato salina a 1X gelada (PBS) e após centrifugação seguindo o padrão anterior, foram adicionados 250 μl de PBS mais 750 μl reagente Trizol® (Invitrogen, EUA) ao *pellet* obtido. A extração foi procedida seguindo a técnica derivada pelo método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (Chomczynski & Sacchi 1987). Além das amostras dos pacientes com AF, foram utilizadas 43 amostras de doadores saudáveis com perfil de hemoglobina normal (Hb AA), pareados por idade (mediana de idade: 25 anos; intervalo: 19 a 38 anos) e sexo (17 homens; 39,5%) com as amostras dos pacientes com AF para comparações quanto ao perfil de expressão de ANXA2. As amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND-*

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

4.5.4 Análise do perfil de expressão relativa de *ANXA2*

Seguindo a síntese do cDNA, as reações de PCR em tempo real quantitativas (RT-qPCR) foram realizadas em duplicata em placas ópticas MicroAmp de 96 poços utilizando o equipamento Aria MX (Agilent technologies, Santa Clara, CA, EUA) utilizando o gene *GAPDH* humano como controle endógeno (Número de catálogo: #4310884E; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A expressão relativa de *ANXA2* foi quantificada utilizando o *TaqMan® Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Sumariamente, cada reação tinha 20 µl de volume final, contendo 10 µl de 2X Master Mix Universal TaqMan, 200 ng de cDNA e 1 µl de 20X dos *primers* e suas sondas. Cada sonda específica (capaz de diferenciar todos os transcritos de *ANXA2* e do controle endógeno *GAPDH*) (*ANXA2* ID do ensaio: Hs00743063_s1) foi marcada com o fluoróforo FAM e seu quencher não-fluorescente. A ciclagem para os ensaios foi inicialmente 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Nos casos de discrepância igual ou superior a 1 dos valores de ciclo de *threshold* (Ct) entre as duplicatas, uma terceira reação foi realizada. O método comparativo dos Ct's foi usado para

determinar a expressão relativa de *ANXA2*. A diferença no número de Ct ($\Delta Ct = Ct_{ANXA2} - Ct_{GAPDH}$) foi calculado para cada replicata. Amplificações gênicas não detectadas até o ciclo de número 40, tiveram valor igual a zero (0).

A expressão de *ANXA2* foi calculada relativa a um cDNA de referência (composto por um *pool* de amostras de indivíduos saudáveis com perfil de hemoglobina normal (AA)) que foi definida como valor um (1). É importante salientar esta amostra de referência foi usada como um controle interno em todos os experimentos e seus resultados foram comparados em todos os experimentos. Os valores de quantificação relativa de *ANXA2* foram calculados segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{pacientesAF}} - \Delta Ct_{\text{referência (Hb AA)}}$ (Livak & Schmittgen 2001).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínicas-laboratoriais dos pacientes foram mostradas descritivamente. O teste Chi-quadrado ou exato de Fisher's (quando aplicável) foi utilizado para comparações entre variáveis categóricas e o Kruskal-Wallis foi utilizada para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação a data de nascimento. Curvas de incidência cumulativa foram construídas refletindo o tempo para o desenvolvimento das complicações com o teste de Gray utilizado para a comparação das curvas (Kim 2007). Análises univariadas de regressão proporcional de *Hazard* (PH) foram conduzidas na busca por fatores prognósticos para as complicações. Os fatores que apresentaram um *P*-valor < 0.1 foram selecionadas para o modelo de análise multivariada. As variáveis escolhidas foram testadas com a linearidade assumida para todas as variáveis contínuas examinadas por modelos de PH. Todos os valores de *P* foram ajustados para os dois lados com nível de

significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation), Stata Statistic/Data Analysis versão 12 (Stata corporation, EUA) e R 2.10.1 (The CRAN project: www.r-project.org).

5. RESULTADOS

5.1 MARCADORES CLÁSSICOS DA ANEMIA FALCIFORME

Quanto aos marcadores clássicos da doença, a combinação haplotípica CAR/CAR mostrou-se como o mais prevalente, estando presente em 399 pacientes (56,5%) analisados, em comparação com as demais combinações haplotípicas (CAR/BEN, CAR/ATP, BEN/BEN, BEN/ATP ou combinações com CAMER, SEN e SAU). Já a co-herança com a talassemia alfa (α) mostrou presente em 168 pacientes, tendo assim uma prevalência de 23,8% na população estudada. Uma visão geral sobre esses dados, pode ser visto na Tabela 7.

5.2 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE *ANXA2*

Dos 714 pacientes incluídos no estudo, as pesquisas dos polimorfismos IVS-14-1046 C→T (rs7163836) e *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) foram realizadas em 438 pacientes (61,3%) e 704 pacientes (98,6%), respectivamente. As populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Com relação ao polimorfismo IVS-14-1046 C→T (rs7163836), 136 pacientes (31%) apresentaram o genótipo selvagem (CC), 214 pacientes (49%) apresentaram o genótipo heterozigoto (CT) e 88 pacientes (20%) apresentaram o genótipo homozigoto variante (TT), enquanto que para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), 105 pacientes (15%) apresentaram o genótipo selvagem (GG), 285 pacientes (40%) apresentaram o genótipo heterozigoto (GA) e 314 pacientes (45%) apresentaram o genótipo homozigoto variante (AA). Para as análises de associação, foram empregados os modelos de herança genética recessivo, dominante e codominante para ambos os polimorfismos avaliados.

Independente do modelo empregado, nenhuma associação foi observada entre variáveis clínicas e laboratoriais e a presença do polimorfismo IVS-14-1046 C→T (rs7163836) em pacientes com anemia falciforme, como pode ser visto no material suplementar (Tabela suplementar 1).

As características laboratoriais foram similares entre os grupos homozigoto variante (AA) e homozigotos selvagens mais heterozigotos (GG + GA) para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), exceto por maiores contagens de plaquetas no grupo dos GA mais GG ($P = 0.043$) e uma tendência dos homozigotos selvagem (AA) de apresentarem mais do que 3 CVO's por ano ($P = 0.086$). As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes falciformes com relação ao polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) estão resumidas na Tabela 7, não foi observada diferença entre a sobrevida global dos pacientes com base nos genótipos do *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) apresentados (Figura 4).

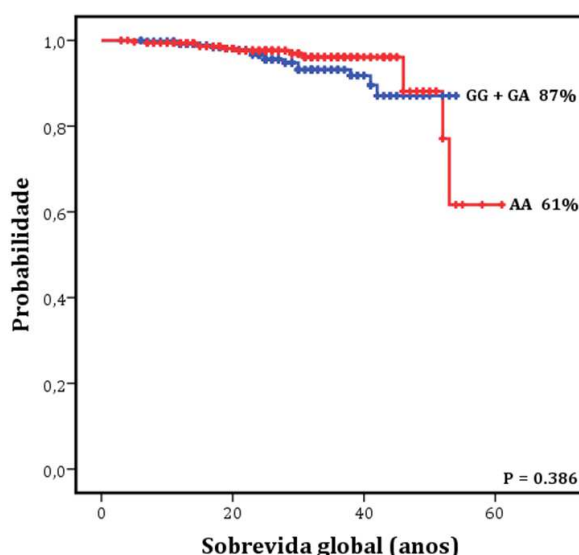


Figura 4. Sobrevida global dos pacientes incluídos no estudo de acordo com os genótipos para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178).

Aplicando o modelo de herança recessivo, temos que 52,8% e 25,2% dos pacientes com genótipo homozigoto variante (AA) e homozigoto selvagem mais

heterozigoto (GG + GA) para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) desenvolveram osteonecrose, respectivamente, com análise univariada, demonstrando que pacientes com genótipo AA tem um risco 3 vezes maior de desenvolverem osteonecrose (*Odds Ratio* (OR): 3.32; Intervalo de confiança (IC) 95%: 1.87-5.89; $P < 0.0001$). Estes dados são consistentes com as análises de regressão logística (OR: 3.08; IC95%: 1.62-5.83; $P = 0.001$), sexo, idade, níveis de hemoglobina fetal (%), número de CVO's por ano como variáveis de confundimento (Tabela 8).

Tabela 8. Análise univariada e multivariada para risco de desenvolvimento da osteonecrose na AF.

Desfecho	Variáveis do modelo	Análise Univariada				Análise Multivariada			
		OR	HR	IC 95%	P-valor	OR	HR	IC 95%	P-valor
Risco de osteonecrose	<i>ANXA2</i> *5681 genótipos: AA vs GG e GA	3.21		1.85 5.58	<0.0001	3.08		1.62 5.83	0.001
	Níveis de hemoglobina fetal (%): variável continua	0.91		0.86 0.97	0.006	0.93		0.87 1.00	0.060
	Número de CVO's por ano no ultimo ano: <2 vs 3-5 vs >6	3.07		1.98 4.76	<0.0001	2.65		1.61 4.39	<0.0001
	Sexo: Masculino vs Feminino	0.45		0.26 0.77	0.004	0.46		0.24 0.88	0.020
	Idade (anos): variável continua	1.06		1.03 1.09	<0.0001	1.05		1.02 1.09	0.001
Probabilidade cumulativa de osteonecrose	<i>ANXA2</i> *5681 genótipos: AA vs GG e GA		2.27	1.44 3.59	<0.0001		2.36	1.45 3.85	0.001
	Níveis de hemoglobina fetal (%): variável continua		0.94	0.88 0.98	0.018		0.94	0.89 1.00	0.054
	Número de CVO's por ano no ultimo ano: <2 vs 3-5 vs >6		2.03	1.49 2.76	<0.0001		1.88	1.33 2.66	<0.0001
	Sexo: Masculino vs Feminino		0.58	0.38 0.90	0.017		0.66	0.41 1.06	0.092
	Idade (anos): variável continua		0.95	0.92 0.98	0.007		0.94	0.91 0.98	0.002

NOTA: *Odds ratios* ou *hazard ratios* (HR) > 1 ou < 1 indicam o aumentou ou diminuição do risco, respectivamente, de um evento para a primeira categoria listada.

Ademais, 58,7% e 53,9% dos pacientes com genótipo homozigoto variante (AA) e homozigoto selvagem mais heterozigoto (GG + GA) para o mesmo polimorfismo

desenvolveram úlceras de perna, respectivamente (OR: 1.66; IC95%: 1.026-2.685; $P = 0.040$). Contudo, a regressão logística mostrou que o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) não reteve sua associação com o desenvolvimento de úlceras de perna (OR: 1.67; IC95%: 0.93-2.98; $P = 0.084$) considerando os níveis de hemoglobina fetal (%), número de CVO's por ano, gênero, idade e co-herança com a alfa-talassemia, como variáveis de confundimento (Tabela 9).

Tabela 9. Análise univariada e multivariada para risco de desenvolvimento da úlceras de perna na AF.

Desfecho	Variáveis do modelo	Análise Univariada				Análise Multivariada			
		OR	IC 95%		P -valor	OR	IC 95%		P -valor
Risco de Úlceras de perna	<i>ANXA2</i> *5681 genótipos: AA vs GG e GA	1.66	1.02	2.68	0.039	1.67	0.93	2.98	0.084
	Níveis de hemoglobina fetal (%): variável contínua	0.85	0.80	0.90	<0.0001	0.86	0.80	0.92	<0.0001
	Número de CVO's por ano no último ano: <2 vs 3-5 vs >6	2.17	1.46	3.23	<0.0001	1.67	1.05	2.66	0.030
	Sexo: Masculino vs Feminino	0.41	0.25	0.66	<0.0001	0.46	0.25	0.82	0.010
	Idade (anos): variável contínua	1.07	1.04	1.09	<0.0001	1.06	1.03	1.09	<0.0001
	Co-herança com alfa-talassemia: mutado vs normal	0.55	0.31	0.96	0.037	0.44	0.22	0.85	0.014
NOTA: Odds ratios (OR) > 1 ou < 1 indicam o aumento ou diminuição do risco, respectivamente, de um evento para a primeira categoria listada.									

A presença do polimorfismo intergênico em homozigose (AA) esteve associado a um risco de 1,5 vezes maior de desenvolvimento de complicações clínicas crônicas (OR: 1.511; IC95%: 1.121-2.038; $P = 0.008$). Ao analisar a frequência do alelo polimórfico A de *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) com o desenvolvimento das úlceras de perna e osteonecrose, observamos que o mesmo não está associado com o desenvolvimento das úlceras de perna ($P = 0.247$; OR: 1,237; IC95%: 0,872-1,754), porém, encontra-se associado com o desenvolvimento de osteonecrose ($P = 0.0002$; OR: 2,28; IC95%: 1,463-3,555), como pode ser visto na tabela 10.

Tabela 10. Análise alélica do polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), para o desenvolvimento de osteonecrose.

Osteonecrose	Alelos	
	A	G
Sim	132 (78,5%)	36 (21,5%)
Não	164 (61,6%)	102 (38,4%)
$P = 0.0002$; OR: 2.28; IC95%: 1.463-3.555)		

5.3 DESFECHO DA OSTEONECROSE E DAS ÚLCERAS DE PERNA EM PACIENTES COM AF *VERSUS* OS DIFERENTES GENÓTIPOS DE *ANXA2**5681 G→A

O impacto do polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) no modelo recessivo (homozigoto selvagem, GG e heterozigoto, GA *versus* homozigoto variante, AA) foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento da osteonecrose. Dos 84 pacientes que desenvolveram osteonecrose, 82 pacientes (97,6%) apresentaram o relato de diagnóstico da complicação na data aproximada, sendo estes utilizados para o modelo de risco cumulativo.

A idade mediana dos pacientes no momento do diagnóstico da osteonecrose foi de 25 anos (intervalo: 8 a 45 anos). A média de seguimento para o desenvolvimento da osteonecrose foi de 36 anos (IC95%: 34 a 39 anos). Os pacientes homozigotos selvagens (GG) e heterozigotos (GA) apresentaram um segmento médio de 41 anos (IC95%: 38 a 44 anos), enquanto que os pacientes homozigotos variantes (AA) apresentaram um seguimento médio de 32 anos (IC95%: 30 a 35 anos), com taxa de desenvolvimento de osteonecrose de 51% e 88% para cada grupo, respectivamente ($P < 0.001$; Figura 5A). Posteriormente pareando os pacientes que desenvolveram osteonecrose acima dos 20 anos de idade ($n=56$; 68,3%) (idade em que grande dos pacientes permanecem subclínicos para as complicações crônicas do grupo musculo-esquelética-cutânea), observamos que os pacientes com genótipos GG e GA possuem uma taxa de 46% de

desenvolvimento, enquanto que os indivíduos com genótipo AA apresentam uma taxa de 86% ($P < 0.0001$; Figura 5B), com segmento de 44 anos (IC95%: 41 a 47 anos) e 35 anos (IC95%: 33 a 37 anos), respectivamente. Ademais, a análise de risco proporcional de Cox, mostrou que o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) foi independentemente associado com menor tempo no desenvolvimento da osteonecrose (*hazard ratio*, HR: 2.36; IC95%: 1.45-3.85; $P = 0.001$) (Tabela 8), considerando os níveis de hemoglobina fetal (%) e o sexo como variáveis de confundimento.

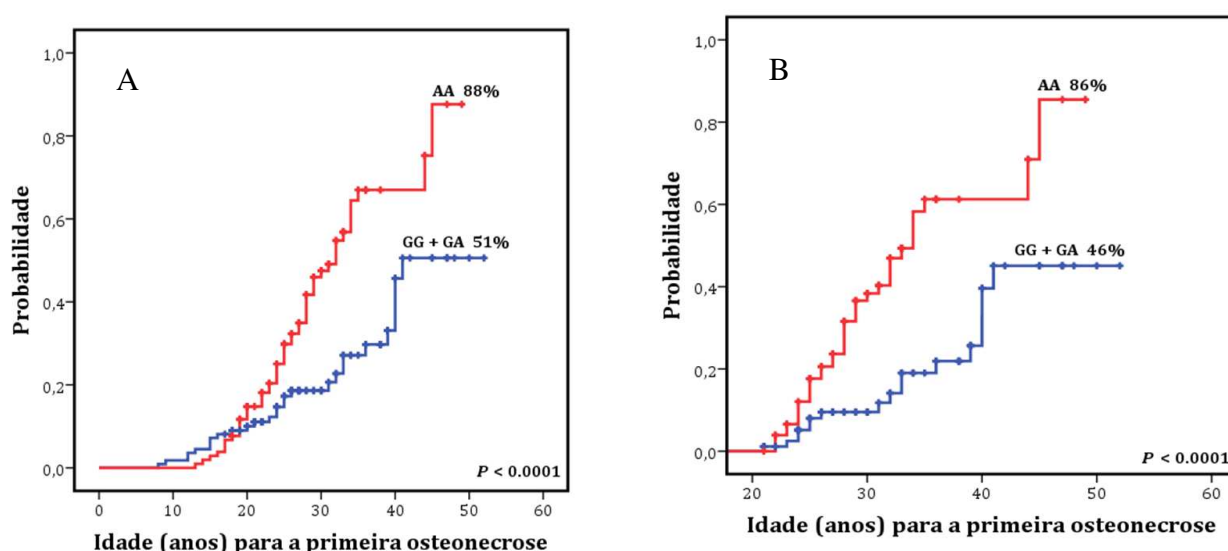


Figura 5. A) Probabilidade de desenvolvimento de osteonecrose dependente do genótipo para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178); B) Probabilidade de desenvolvimento de osteonecrose em pacientes acima dos 20 anos, dependente do genótipo para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178).

De modo similar, o impacto do polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) também no modelo recessivo foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento das úlceras de perna. Dos 143 pacientes que desenvolveram as úlceras de perna, 138 pacientes (96,5%) apresentaram o relato de diagnóstico da complicação na data aproximada, sendo estes utilizados para o modelo de risco cumulativo. A idade mediana dos pacientes no momento do diagnóstico das úlceras de perna foi de 21 anos (intervalo:

4 a 47 anos). A média de seguimento para o desenvolvimento da úlcera foi de 32 anos (IC95%: 30 a 34 anos). Os pacientes com genótipo GG e GA apresentaram um segmento médio de 34 anos (IC95%: 27 a 40 anos), enquanto que os pacientes com genótipo AA apresentaram um seguimento médio de 28 anos (IC95%: 24 a 31 anos), com taxa de desenvolvimento de úlceras de perna de 61% e 89% para cada grupo, respectivamente ($P = 0.138$; Figura 6A). Contudo, após pareamento dos pacientes que desenvolveram as úlceras de perna acima dos 20 anos de idade ($n=78$; 56,5%), observamos que os pacientes com genótipos GG e GA possuem uma taxa de 49% enquanto que os indivíduos com genótipo AA apresentam uma taxa de 86% ($P = 0.020$; Figura 6B), com segmento de 40 anos (IC95%: 37 a 43 anos) e 34 anos (IC95%: 31 a 37 anos), respectivamente.

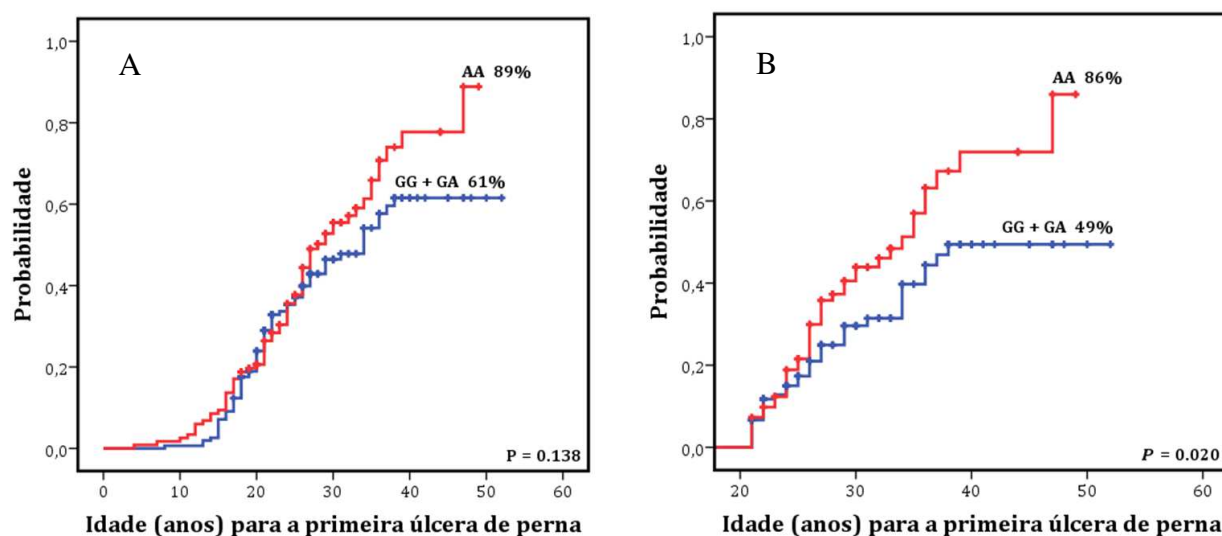


Figura 6. A) Probabilidade de desenvolvimento de úlceras de pernas dependente do genótipo para o polimorfismo ANXA2*5681 G→A (rs7170178); B) Probabilidade de desenvolvimento de úlceras de pernas em pacientes acima dos 20 anos, dependente do genótipo para o polimorfismo ANXA2*5681 G→A (rs7170178).

5.4 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DE *ANXA2* EM PACIENTES COM AF QUE DESENVOLVERAM OSTEONECROSE E ÚLCERAS DE PERNA

Inicialmente, foi comparado os valores de expressão relativa de *ANXA2/GAPDH* nas amostras dos pacientes com AF (n=70) e de doadores saudáveis (n=43), todas genotipadas para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178). Não foi observada diferença entre no perfil de expressão de *ANXA2* entre os doadores saudáveis e os pacientes com AF ($P > 0.05$; Figura 7A). Posteriormente, foi analisado somente levando em consideração os pacientes com AF. Frente aos três prováveis genótipos que poderiam ser apresentados para o polimorfismo intergênico, não foi observada diferença nos níveis de *ANXA2/GAPDH* ($P > 0.05$; Figura 7B), contudo, observou-se que pacientes que foram tratados com hidroxiuréia (HU), apresentaram menores níveis de *ANXA2/GAPDH* que os pacientes que não foram tratados com HU ($P < 0.05$; Figura 7C).

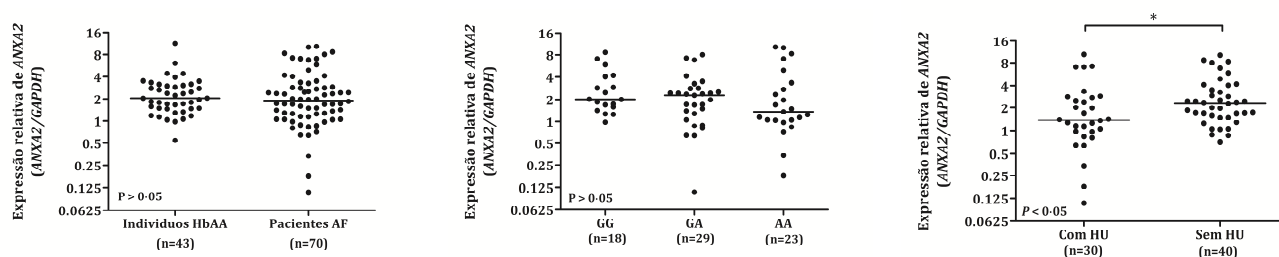


Figura 7. A) Análise quantitativa da expressão de *ANXA2* em amostras de indivíduos saudáveis e pacientes com AF ($P > 0.05$); B) Níveis de *ANXA2/GAPDH* em pacientes com AF de acordo com os três genótipos possíveis para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178); C) O perfil de expressão da *ANXA2* é negativamente regulado pós tratamento com HU. As barras horizontais representam os valores de mediana para expressão de *ANXA2* relativo ao *GAPDH*.

Ao analisar o perfil de expressão de *ANXA2* em pacientes que desenvolveram osteonecrose e úlceras de perna, frente aos genótipos apresentados, observamos que nos pacientes com osteonecrose, a uma redução gradual dos níveis de *ANXA2/GAPDH* nos indivíduos heterozigotos (GA) e homozigotos variantes (AA) quando comparado com os homozigotos selvagens (GG), com uma diferença significativa entre o GG *versus* AA (P

< 0.05 ; Figura 8A). Contudo, avaliando os pacientes com úlceras de perna, embora os pacientes com genótipo AA aparentemente apresentem menores níveis de *ANXA2*, esta diferença não é significativa ($P > 0.05$; Figura 8B). Por fim, categorizando os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos pacientes em quartis (referente aos níveis de expressão relativa *ANXA2/GAPDH*), observamos que os pacientes do primeiro quartil (que possuem os menores níveis de *ANXA2*) desenvolveram com uma taxa maior a osteonecrose (69%) que os pacientes dos outros quartis (57%; $P=0.005$) (Figura suplementar I).

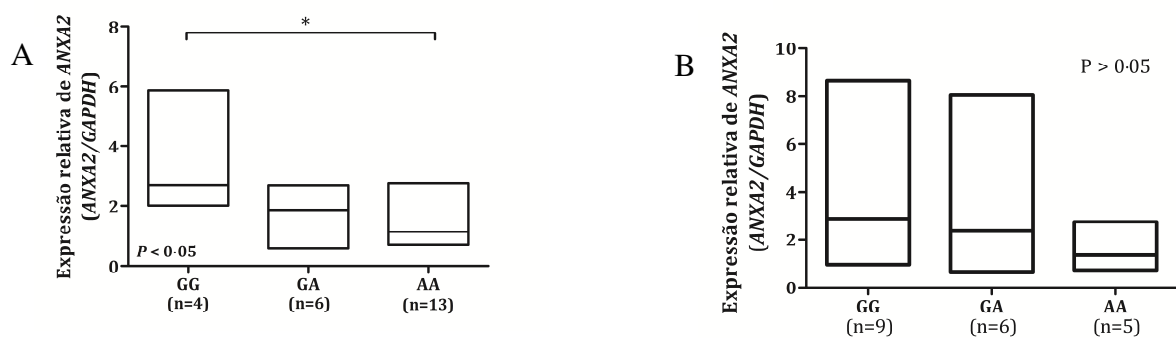


Figura 8. A) Níveis de *ANXA2/GAPDH* em pacientes com AF que desenvolveram osteonecrose de acordo com os três genótipos possíveis para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), observando-se uma diferença entre os pacientes GG vs AA ($P < 0.05$); B) Não foi observada diferença entre os níveis de *ANXA2* frente aos diferentes genótipos em pacientes com úlceras de perna.

Tabela 7. Comparação dos achados clínico-laboratoriais de pacientes com AF de acordo com o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A.

Modelo recessivo de herança genética							65	
Características dos pacientes	Todos os pacientes (n = 714)		Homozigoto variante (AA) (n = 314)		Homozigoto selvagem + heterozigoto (GG + GA) (n = 390)		OR (IC 95%)	P-valor (†)
	No.	%	No.	%	No.	%		
Gênero								0.940
Masculino	347	48,6	155	49,4	191	49	1 (ref.)	
Feminino	367	51,4	159	50,6	199	51	0,985 (0,73-1,33)	
Idade (anos), mediana	25		26		23			
Intervalo	3 – 61		3 – 61		3 – 54			
Idade (anos), categórica								0.422
<18 anos	194	27,2	80	25,6	111	28,5		
Entre 18 e 40 anos	422	59,1	185	58,9	230	59		
>40 anos	98	13,7	49	15,6	49	12,6		
Sobrevida								0.849
Sim	665	95	12	3,9	17	4,5	1 (ref.)	
Não	35	5	297	96,1	364	95,5	0,865 (0,41-1,84)	
Hidroxiuréia								
Sim	328	45,9	152	48,4	174	44,6		
Não	386	54,1	162	51,6	216	55,4		
Presença de alfa-talassemia (**)								0.721
Normal	539	76,2	240	76,9	292	75,6	1 (ref.)	
Mutado	168	23,8	72	23,1	94	24,4	0,932 (0,66-1,32)	
Haplótipo β ^s								0.939
CAR/CAR	399	56,5	176	56,6	216	56,1	1 (ref.)	
Não CAR/CAR	307	43,5	135	43,4	169	43,9	1,02 (0,75-1,38)	
HbF (%), mediana	7,1		7,4		6,9			0.122
Intervalo	0,5 – 28,5		0,8 – 28,5		0,5 – 27,4			
Contagem de hemácias (x10 ¹² /l), mediana	2,53		2,52		2,53			0.961
Intervalo	1,29 – 4,68		1,5 – 4,33		1,29 – 4,68			
Hemoglobina (g/dl), mediana	7,7		7,7		7,7			0.815
Intervalo	4,2 – 11,6		4,8 – 11,6		4,2 – 11,5			
Hematócrito (%), mediana	23,3		23,4		23,2			0.781
Intervalo	12,1 – 35,1		14,7 – 35,1		12,1 – 34,1			
VCM (fL), mediana	91,8		91,6		91,7			0.912
Intervalo	62,6 – 137,3		62,6 – 115,9		66,8 – 125,8			
HCM (g/dl), mediana	30,7		30,7		30,6			0.915
Intervalo	19,8 – 46,4		19,8 – 39,3		20,4 – 41,3			
Contagem de leucócitos (x10 ⁶ /l), mediana	12,1		12		12,15			0.303
Intervalo	4,2 – 34,1		4,2 – 34,1		5,1 – 32,5			
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /l), mediana	416		404		429			0.043*
Intervalo	115,7 – 1016		115,7 – 1016		119 – 870			
Contagem de reticulócitos (%), mediana	9,6		9,8		9,4			0.490
Intervalo	0,4 – 29,2		0,4 – 26,2		0,5 – 29,2			
AST (U/L), mediana	43		42		44			0.101
Intervalo	11 – 235		11 – 235		12 – 150			

Lactato desidrogenase (U/L), mediana	838		884		811		0.123	
Intervalo	192 – 3692		220 – 3692		192 - 3542			
Bilirrubina total (mg/dL), mediana	2,81		2,75		2,84		0.680	
Intervalo	0,07 – 37,02		0,07 – 20,32		0,21 – 37,02			
Bilirrubina indireta (mg/dL), mediana	2,12		2,08		2,18		0.352	
Intervalo	0,07 – 36,19		0,04 – 12,12		0,13 – 36,19			
Número de CVO's por ano, no último ano							0.086	
0-2	385	53,9	158	50,3	221	56,7		
3-5	272	38,1	134	42,7	135	34,6		
>6	57	8	22	7	34	8,7		
Complicações da Anemia falciforme								
Colelitíase							0.533	
Sim	409	68,5	191	70	212	67,3	1 (ref.)	
Não	188	31,5	82	30	103	32,7	1,132 (0,8-1,606)	
Síndrome torácica aguda							0.317	
Sim	82	38	37	42,5	45	35,2	1 (ref.)	
Não	134	62	50	57,5	83	64,8	1,365 (0,78-2,38)	
Úlceras de perna							0.040*	
Sim	143	51,6	71	58,7	71	53,9	1 (ref.)	
Não	134	48,4	50	41,3	83	46,1	1,66 (1,026-2,685)	
Osteonecrose							<0.001*	
Sim	84	38,5	56	52,8	28	25,2	1 (ref.)	
Não	134	61,5	50	47,2	83	74,8	3,32 (1,87-5,89)	
Acidente vascular cerebral (AVC)							0.450	
Sim	70	34,3	30	37,5	39	32	1 (ref.)	
Não	134	65,7	50	62,5	83	68	1,277 (0,707-2,3)	
Faixa de risco para AVC							0.523	
Sim	62	31,6	20	28,6	42	31,8	1 (ref.)	
Não	134	68,4	50	71,4	83	68,2	0,79 (0,418-1,496)	
Priapismo							1.000	
Sim	97	67,8	37	67,3	60	68,2	1 (ref.)	
Não	46	32,2	18	32,7	28	31,8	0,959 (0,467-1,97)	

CAR, República centro-africana; HbF, Hemoglobina fetal; VCM, Volume corpuscular médio; HCM, Hemoglobina corpuscular média; AST, Aspartato aminotransferase; CVO, Crises vaso-oclusivas; AVC, Acidente vascular cerebral;

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

**Presença do traço da alfa (α)-talassemia: deleção -3.7kb (- α 3.7);

†Valores não disponíveis foram excluídos para o cálculo do *P-valor*.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que o polimorfismo intergênico *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) esteve associado com uma maior frequência de casos de osteonecrose e úlceras de perna em pacientes com anemia falciforme (Hb SS). Posteriormente, com uma mediana de seguimento de 20 anos, os pacientes homozigotos variantes (AA) apresentaram uma maior taxa de desenvolvimento de osteonecrose e úlceras de perna quando comparados com pacientes heterozigotos (GA) e homozigotos selvagens (GG). E por fim, os níveis de *ANXA2* são regulados negativamente de modo genótipo dependente para o polimorfismo intergênico *ANXA2**5681 em pacientes com AF que desenvolveram osteonecrose.

A doença falciforme é a considerada a causa mais comum de osteonecrose em indivíduos jovens (Milner *et al.* 1991), sendo caracterizada como uma complicação crônica e debilitante da doença, afetando aproximadamente 50% dos pacientes homozigotos para a mutação β^s (HbSS) até os 35 anos de idade (Marsh *et al.* 2015). Contudo, a fisiopatologia da osteonecrose na AF permanece desconhecida (Lemonne *et al.* 2013), visto que, pacientes com osteonecrose são frequentemente assintomáticos durante os estágios iniciais, sendo os métodos de diagnóstico mais utilizados úteis em estágios já avançados desta complicação (Marsh *et al.* 2015). Deste modo, a busca por novos marcadores moleculares de aplicação clínica na identificação de indivíduos com risco elevado para o desenvolvimento de osteonecrose têm sido largamente pesquisados na última década, entretanto muitos estudos têm sido conduzidos em coortes de tamanho limitado e sem validações funcionais (Chaouch *et al.* 2015; Ulug *et al.* 2009). Assim a busca por componentes genéticos determinantes na fisiopatologia da osteonecrose necessita de estudos futuros.

Embora a fisiopatologia da osteonecrose seja pouco compreendida, atualmente sugere-se que lesões silenciosas decorrentes de uma progressiva oclusão da microcirculação óssea, levem a uma morte dos osteoblastos presentes com subsequente aumento na pressão intraóssea, conduzindo a osteonecrose nestes pacientes (Worrall *et al.* 2015). Assim, o provável evento inicial, a senescência das células percussoras ósseas (osteoblastos), com ativação do sistema de reparo tecidual, elevaria ainda mais a pressão intramedular, tendo como desfecho a reabsorção do tecido ósseo e colapso da estrutura (Marsh *et al.* 2015).

No presente estudo, foi avaliado o gene *ANXA2*, previamente descrito por atuar modulando a osteogênese, promovendo uma mineralização eficiente das células ósseas, bem como auxiliando no processo de remoção da fibrina intravascular (Flood & Hajjar 2011; Genetos *et al.* 2014). Baldwin e cols. (2005), identificaram associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP's) no gene *ANXA2* distribuídos ao longo do gene (em regiões intrônicas e intergênicas), com o desenvolvimento de osteonecrose em uma coorte de 442 pacientes AF da América do Norte com esta manifestação. Resultados semelhantes foram relatados por Pandey e cols. (2012), avaliando uma coorte de pacientes indianos com AF que desenvolveram osteonecrose comparando-os com pacientes AF sem esta manifestação e com indivíduos saudáveis (HbAA). Estes autores propõem que estes polimorfismos podem atuar como reguladores negativos da expressão de *ANXA2*, o que poderia acarretar um maior comprometimento na microcirculação óssea, por um depósito anormal de fibrina, além de conduzir a uma falha na mineralização óssea, que juntos, acarretariam aos indivíduos afetados, um microambiente ósseo favorável para o desenvolvimento de osteonecrose (Baldwin *et al.* 2005; Pandey *et al.* 2012b)

Contudo, até onde sabemos, nosso estudo foi o primeiro a correlacionar o polimorfismo no gene *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) com um desenvolvimento precoce de osteonecrose, levando em conta o genótipo dos pacientes, onde os indivíduos com genótipos AA (homozigoto variante) apresentaram uma maior frequência de desenvolvimento desta complicação (88%), com um menor tempo de seguimento (32 anos, IC95%: 30 a 35 anos) (ver figura 5). Além disto, nosso estudo mostrou que este polimorfismo foi independentemente associado a um menor tempo de desenvolvimento da osteonecrose.

Ademais, mostramos que nos pacientes com AF que desenvolveram osteonecrose, este polimorfismo apresentou-se como um modulador negativo da expressão do gene *ANXA2*, o que pode conduzir a uma situação de baixos níveis proteicos. Ao avaliarmos o perfil de expressão de *ANXA2* frente ao risco cumulativo de desenvolvimento da osteonecrose, observamos que baixos níveis de *ANXA2* estão relacionados a uma maior taxa de desenvolvimento da osteonecrose em um menor intervalo de tempo (Figura suplementar I) Este fato, corrobora a proposta de que uma redução nos níveis de anexina A2 contribuiria para um ambiente molecular favorável ao desenvolvimento da osteonecrose, com falha na remoção de fibrina intravascular associado a uma precária mineralização óssea. Corroborando a hipótese acima temos uma tendência quanto a associação do polimorfismo intergênico com um aumento no número de crises vasclusivas ($P = 0.086$). Contudo, nós não avaliamos a correlação direta entre os níveis de transcritos e os níveis proteicos ou o *status* funcional da proteína, e nossos resultados refletem os dados de expressão gênica de uma pequena coorte avaliada ($n=23$).

Além da associação com o desenvolvimento de osteonecrose em nossa amostra de pacientes, este estudo é o primeiro a mostrar o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) associado com o desenvolvimento de úlceras de perna de modo univariado.

Contudo, esta mesma associação não foi reproduzida quando consideramos a presença do alelo polimórfico (A) univariadamente nem na regressão logística, frente aos fatores prognósticos associados com o surgimento das úlceras de perna (Rego *et al.* 2015). Contudo, o risco cumulativo mostrou que os pacientes homozigotos variantes (AA) aparentam ter uma maior taxa de úlceras de perna (86%) em um menor tempo de segmento médio (34 anos; IC95%: 31 a 37 anos) que os pacientes com genótipos GG e GA (49%; 40 anos; IC95%: 37 a 43 anos) nos pacientes acima dos 20 anos de idade. Aos vinte anos de idade um grande percentual dos pacientes com AF são classificados como subclínicos para grande parte das complicações, e deste modo o polimorfismo intergênico mostra-se como uma valiosa ferramenta de triagem para os pacientes que apresentam uma maior predisposição a determinadas complicações clínicas. Ademais, vale salientar que grande parte dos pacientes com AF desenvolvem mais de uma complicação ao longo de seu segmento clínico, sugerindo que as bases moleculares envolvidas na gênese das complicações possam estar interligadas (Pandey *et al.* 2012a). Fato este que é reforçado pelos nossos resultados, evidenciando que os pacientes homozigotos para o polimorfismo intergênico (AA) apresentam um maior índice de desenvolvimento de complicações clínicas crônicas.

As úlceras de perna são as complicações cutâneas mais debilitantes da AF, responsáveis por drásticas sequelas físicas e psicológicas. De maneira geral são marcadas por altos índices de recorrência e cronicidade, devido a sua difícil cicatrização (Alavi & Kirsner 2015) Recentemente, a anexina A2 teve seu papel ligado com o controle do processo de divisão celular (Benaud *et al.* 2015) e foi demonstrado que uma depleção da Anx2 foi ligada a uma parada no processo mitótico. Pouco se sabe a respeito da etiologia das úlceras de perna, sobretudo a despeito das lesões que surgem sem um agente causal prévio (como traumas), mas estudos apontam que as vias de proliferação

celular nestas lesões estão comprometidas (Beidler *et al.* 2009; Nolan *et al.* 2006). Neste cenário, a Anx2 mostra-se como um agente agravante para a manutenção da lesão ulcerativa, comprometendo a cicatrização no local e exacerbando os eventos vasoclusivos focais, acentuando a hemólise, principal agente causal das úlceras de perna (Kato *et al.* 2007).

Não encontramos associação entre os níveis de *ANXA2* e os diferentes genótipos do polimorfismo *ANXA2**5681 G→A nos pacientes com AF que apresentaram úlceras de perna, embora os indivíduos com genótipo AA apresentassem a mediana mais baixa dentre os três genótipos possíveis (Figura 9B). Estes achados podem ser devido a um baixo número de indivíduos avaliados (n=20) e devido a uma regulação no local da lesão dos níveis de expressão de genes relacionados com o processo de reparação tecidual, necessitando assim que a avaliação fosse conduzida em amostras obtidas do foco da lesão em comparação com o tecido saudável, para confirmar ou refutar essa hipótese.

Em 2011, em um trabalho realizado por Flanagan e cols. (Flanagan *et al.* 2011) os autores demonstraram uma associação entre polimorfismos no gene *ANXA2* com o desenvolvimento do AVC, em uma população de indivíduos com AF. Em nosso trabalho, não foi encontrada esta associação, o que pode ser explicado pelo fato de, embora existam diversos polimorfismos associados com a proteção ou risco para as manifestações fenotípicas específicas da AF, a grande maioria dos polimorfismos identificados até o presente momento, exprimem um limitado efeito fenotípico no amplo espectro da doença (Steinberg & Sebastiani 2012). Mesmo a vasoclusão e a hemólise desempenhando papéis complementares na gênese das complicações clínicas da AF, acredita-se que grupos distintos de pacientes apresentem uma predileção para um dos mecanismos, desenvolvendo futuramente, manifestações clínicas distintas e características aos mecanismos basais (Kato *et al.* 2007). Embora nossos dados

confrontem o possível mecanismo proposto para a gênese das complicações crônicas, visto que encontramos associação com o desenvolvimento de osteonecrose (complicação ligada ao fenótipo vasclusivo) e úlceras de perna (complicação ligada ao fenótipo hemolítico).

Um crescente número de moduladores genéticos utilizáveis como potenciais candidatos para o surgimento das múltiplas complicações clínicas da AF, aponta cada vez mais para um uso integrativo destes (incluindo o uso dos marcadores clássicos da doença como a co-herança com a alfa-talassemia, o haplótipo ligado a globina β^S e os níveis de hemoglobina fetal) na prática clínica, auxiliando nas recomendações já previstas para manejo da AF (Drawz *et al.* 2015; Ware 2015; Ware *et al.* 2015). No contexto clínico, esta iniciativa representaria um ganho significativo na prevenção das complicações clínicas e proveria uma medicina personalizada aos pacientes, somado beneficemente ao seu curso clínico.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Apenas o polimorfismo intergênico *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) mostrou-se associado com desenvolvimento de complicações clínicas crônicas como a osteonecrose e as úlceras de perna;
- Pacientes com genótipo AA (homozigoto variante) para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), apresentaram um menor tempo mediano para o desenvolvimento de osteonecrose, quando comparados com os genótipos GG (homozigoto selvagem) e GA (heterozigoto);
- Pacientes com genótipo AA (homozigoto variante) para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178), apresentaram um menor tempo mediano para o desenvolvimento de úlceras de perna, quando comparados com os genótipos GG (homozigoto selvagem) e GA (heterozigoto) a partir dos vinte anos de idade;
- O polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) está independentemente associado com um menor tempo no desenvolvimento da osteonecrose, considerando o sexo, idade, níveis de hemoglobina fetal (%), número de CVO's por ano como confundidores;
- Pacientes que realizam tratamento com hidroxiuréia tem menores níveis de *ANXA2* que pacientes que não realizam tratamento;

- Pacientes com osteonecrose que possuem o genótipo AA para o polimorfismo *ANXA2**5681 G→A (rs7170178) tem menores níveis de expressão relativa de *ANXA2* que pacientes com genótipo homozigoto selvagem.

REFERÊNCIAS

- Abecasis, G. R., A. Auton, L. D. Brooks, M. A. DePristo, R. M. Durbin *et al.* 2012 An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature** 491: 56-65.
- Adams, R. J., V. C. McKie, L. Hsu, B. Files, E. Vichinsky *et al.* 1998a Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **N.Engl.J.Med.** 339: 5-11.
- Adams, R. J., V. C. McKie, L. Hsu, B. Files, E. Vichinsky *et al.* 1998b Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. **N.Engl.J.Med.** 339: 5-11.
- Alavi, A., and R. S. Kirsner, 2015 Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. **Int.J.Low Extrem.Wounds.** 14: 213-216.
- Alsultan, A., M. K. Alabdulaali, P. J. Griffin, A. M. Alsuliman, H. A. Ghabbour *et al.* 2014 Sickle cell disease in Saudi Arabia: the phenotype in adults with the Arab-Indian haplotype is not benign. **Br.J.Haematol.** 164: 597-604.
- Anele, U. A., B. V. Le, L. M. Resar, and A. L. Burnett, 2015 How I treat priapism. **Blood** 125: 3551-3558.
- Ataga, K. I., J. E. Brittain, P. Desai, R. May, S. Jones *et al.* 2012 Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. **PLoS.One.** 7: e29786.
- Baldwin, C., V. G. Nolan, D. F. Wyszynski, Q. L. Ma, P. Sebastiani *et al.* 2005 Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood** 106: 372-375.
- Ballas, S. K., M. R. Kesen, M. F. Goldberg, G. A. Luty, C. Dampier *et al.* 2012 Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **ScientificWorldJournal.** 2012: 949535.
- Ballas, S. K., S. Lieff, L. J. Benjamin, C. D. Dampier, M. M. Heeney *et al.* 2010 Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am.J.Hematol.** 85: 6-13.
- Bandeira, F. M., M. N. Santos, M. A. Bezerra, Y. M. Gomes, A. S. Araujo *et al.* 2008 [Family screening for HBB*S gene and detection of new cases of sickle cell trait in Northeastern Brazil]. **Rev.Saude Publica** 42: 234-241.
- Beidler, S. K., C. D. Douillet, D. F. Berndt, B. A. Keagy, P. B. Rich *et al.* 2009 Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. **J.Vasc.Surg.** 49: 1013-1020.

- Belisario, A. R., R. R. Sales, N. E. Toledo, C. Velloso-Rodrigues, C. M. Silva *et al.* 2015 Association between ENPP1 K173Q and stroke in a newborn cohort of 395 Brazilian children with sickle cell anemia. **Blood** **126**: 1259-1260.
- Benaud, C., D. G. Le, S. Mironov, F. Galli, D. Rebutier *et al.* 2015 Annexin A2 is required for the early steps of cytokinesis. **EMBO Rep.** **16**: 481-489.
- Benaud, C., and C. Prigent, 2016 Annexin A2: A new player in mitosis. *Cell Cycle* **15**: 9-10.
- Bezerra, M. A., M. N. Santos, A. S. Araujo, Y. M. Gomes, F. G. Abath *et al.* 2007 Molecular variations linked to the grouping of beta- and alpha-globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the State of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin** **31**: 83-88.
- Bharadwaj, A., M. Bydoun, R. Holloway, and D. Waisman, 2013 Annexin A2 heterotetramer: structure and function. **Int.J.Mol.Sci.** **14**: 6259-6305.
- Bhatnagar, P., E. Barron-Casella, C. J. Bean, J. N. Milton, C. T. Baldwin *et al.* 2013 Genome-wide meta-analysis of systolic blood pressure in children with sickle cell disease. **PLoS.One.** **8**: e74193.
- Cajado, C., B. A. Cerqueira, F. D. Couto, J. P. Moura-Neto, W. Vilas-Boas *et al.* 2011 TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine** **56**: 312-317.
- Castro, O., D. J. Brambilla, B. Thorington, C. A. Reindorf, R. B. Scott *et al.* 1994 The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **Blood** **84**: 643-649.
- Chaouch, L., M. Kalai, M. B. Jbara, A. B. Chaabene, I. Darragi *et al.* 2015 Association between rs267196 and rs267201 of BMP6 gene and osteonecrosis among sickle cell anemia patients. **Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.** **159**: 145-149.
- Chasserot-Golaz, S., N. Vitale, E. Umbrecht-Jenck, D. Knight, V. Gerke *et al.* 2005 Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. **Mol.Biol.Cell** **16**: 1108-1119.
- Cherukuri, A., M. Dykstra, and S. K. Pierce, 2001 Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. **Immunity.** **14**: 657-660.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi, 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal.Biochem.** **162**: 156-159.
- Colella, M. P., E. V. de Paula, J. A. Machado-Neto, N. Conran, J. M. Annichino-Bizzacchi *et al.* 2015 Elevated hypercoagulability markers in hemoglobin SC disease. **Haematologica** **100**: 466-471.

- Connes, P., Y. Lamarre, M. D. Hardy-Dessources, N. Lemonne, X. Waltz *et al.* 2013 Decreased hematocrit-to-viscosity ratio and increased lactate dehydrogenase level in patients with sickle cell anemia and recurrent leg ulcers. **PLoS.One.** **8**: e79680.
- Connes, P., Y. Lamarre, X. Waltz, S. K. Ballas, N. Lemonne *et al.* 2014 Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. **Br.J.Haematol.** **165**: 564-572.
- Conran, N., C. F. Franco-Penteado, and F. F. Costa, 2009 Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin** **33**: 1-16.
- Costa, D., M. Capuano, L. Sommese, and C. Napoli, 2015 Impact of epigenetic mechanisms on therapeutic approaches of hemoglobinopathies. **Blood Cells Mol.Dis.** **55**: 95-100.
- Creutz, C. E., 1992 The annexins and exocytosis. **Science** **258**: 924-931.
- de Azevedo, S. J., F. K. Monteiro, J. A. Tres Pancotto, F. T. Sotero, E. A. Donadi *et al.* 2013 Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus clinical manifestations. **Lupus** **22**: 1110-1117.
- De, F. L., M. D. Cappellini, and O. Olivieri, 2011 Thrombosis and sickle cell disease. **Semin.Thromb.Hemost.** **37**: 226-236.
- Delaney, K. M., K. C. Axelrod, A. Buscetta, K. L. Hassell, P. E. Adams-Graves *et al.* 2013 Leg ulcers in sickle cell disease: current patterns and practices. **Hemoglobin** **37**: 325-332.
- Dode, C., R. Krishnamoorthy, J. Lamb, and J. Rochette, 1993 Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. **Br.J.Haematol.** **83**: 105-111.
- Domingos, I. F., D. A. Falcao, B. L. Hatzlhofer, A. F. Cunha, M. N. Santos *et al.* 2014 Influence of the betas haplotype and alpha-thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann.Hematol.** **93**: 1123-1129.
- Drawz, P., S. Ayyappan, M. Nouraie, S. Saraf, V. Gordeuk *et al.* 2015 Kidney Disease among Patients with Sickle Cell Disease, Hemoglobin SS and SC. **Clin.J.Am.Soc.Nephrol.**
- Driss, A., K. O. Asare, J. M. Hibbert, B. E. Gee, T. V. Adamkiewicz *et al.* 2009 Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights.** **2009**: 23-48.
- Fan, X., Z. Yu, J. Liu, N. Liu, K. A. Hajjar *et al.* 2010 Annexin A2: a tissue plasminogen activator amplifier for thrombolytic stroke therapy. **Stroke** **41**: S54-S58.
- Faure, A. V., C. Migne, G. Devilliers, and J. Ayala-Sanmartin, 2002 Annexin 2 "secretion" accompanying exocytosis of chromaffin cells: possible mechanisms of annexin release. **Exp.Cell Res.** **276**: 79-89.

- Flanagan, J. M., D. M. Frohlich, T. A. Howard, W. H. Schultz, C. Driscoll *et al.* 2011 Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **Blood** **117**: 6681-6684.
- Flood, E. C., and K. A. Hajjar, 2011 The annexin A2 system and vascular homeostasis. **Vascul.Pharmacol.** **54**: 59-67.
- Galbiati, F., B. Razani, and M. P. Lisanti, 2001 Emerging themes in lipid rafts and caveolae. **Cell** **106**: 403-411.
- Gayen, B. S., and B. N. Setty, 2008 Phosphatidylserine-positive erythrocytes bind to immobilized and soluble thrombospondin-1 via its heparin-binding domain. **Transl.Res.** **152**: 165-177.
- Genetos, D. C., A. Wong, T. J. Weber, N. J. Karin, and C. E. Yellowley, 2014 Impaired osteoblast differentiation in annexin A2- and -A5-deficient cells. **PLoS.One.** **9**: e107482.
- Gerke, V., and S. E. Moss, 2002 Annexins: from structure to function. **Physiol Rev.** **82**: 331-371.
- Gillette, J. M., D. C. Chan, and S. M. Nielsen-Preiss, 2004 Annexin 2 expression is reduced in human osteosarcoma metastases. **J.Cell Biochem.** **92**: 820-832.
- Gillette, J. M., and S. M. Nielsen-Preiss, 2004 The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. **J.Cell Sci.** **117**: 441-449.
- Gladwin, M. T., G. J. Kato, D. Weiner, O. C. Onyekwere, C. Dampier *et al.* 2011 Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: a randomized controlled trial. **JAMA** **305**: 893-902.
- Hassan, S. M., M. M. Al, R. M. Al, E. Bakker, C. L. Harteveld *et al.* 2014 Sickle cell anemia and alpha-thalassemia: a modulating factor in homozygous HbS/S patients in Oman. **Eur.J.Med.Genet.** **57**: 603-606.
- Hedhli, N., D. J. Falcone, B. Huang, G. Cesarman-Maus, R. Kraemer *et al.* 2012 The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms. **J.Biomed.Biotechnol.** 2012: 406273.
- Higgs, D. R., 2013 The molecular basis of alpha-thalassemia. **Cold Spring Harb.Perspect.Med.** **3**: a011718.
- Ho, P. J., and S. L. Thein, 2000 Gene regulation and deregulation: a beta globin perspective. **Blood Rev.** **14**: 78-93.
- Hoppe, C., W. Klitz, K. D'Harlingue, S. Cheng, M. Grow *et al.* 2007 Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke** **38**: 2241-2246.
- Iughetti, L., E. Bigi, and D. Venturelli, 2016 Novel insights in the management of sickle cell disease in childhood. **World J.Clin.Pediatr.** **5**: 25-34.

- Kato, G. J., M. T. Gladwin, and M. H. Steinberg, 2007 Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev.** **21**: 37-47.
- Kennedy, J. R., 2015 Attenuating a sickle cell crisis with annexin V. **Med.Hypotheses** **84**: 434-436.
- Kim, H. T., 2007 Cumulative incidence in competing risks data and competing risks regression analysis. *Clin.Cancer Res.* **13**: 559-565.
- Lanaro, C., C. F. Franco-Penteado, D. M. Albuquerque, S. T. Saad, N. Conran *et al.* 2009 Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J.Leukoc.Biol.** **85**: 235-242.
- Lang, F., E. Lang, and M. Foller, 2012 Physiology and pathophysiology of eryptosis. **Transfus.Med.Hemother.** **39**: 308-314.
- Lemonne, N., Y. Lamarre, M. Romana, M. Mukisi-Mukaza, M. D. Hardy-Dessources *et al.* 2013 Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? **Blood** **121**: 3054-3056.
- Lim, M. Y., K. I. Ataga, and N. S. Key, 2013 Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. **Curr.Opin.Hematol.** **20**: 472-477.
- Ling, Q., A. T. Jacovina, A. Deora, M. Febbraio, R. Simantov *et al.* 2004 Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. **J.Clin.Invest** **113**: 38-48.
- Liu, X., Q. Li, X. Wang, X. Zhou, X. He *et al.* 2015 Evaluation of DNA/RNA shells for room temperature nucleic acids storage. *Biopreserv.Biobank.* **13**: 49-55.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen, 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods** **25**: 402-408.
- Lyra, I. M., M. S. Goncalves, J. A. Braga, M. F. Gesteira, M. H. Carvalho *et al.* 2005 Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cad.Saude Publica** **21**: 1287-1290.
- Maitre, B., A. Habibi, F. Roudot-Thoraval, D. Bachir, D. D. Belghiti *et al.* 2000 Acute chest syndrome in adults with sickle cell disease. **Chest** **117**: 1386-1392.
- Manci, E. A., D. E. Culberson, Y. M. Yang, T. M. Gardner, R. Powell *et al.* 2003 Causes of death in sickle cell disease: an autopsy study. **Br.J.Haematol.** **123**: 359-365.
- Marsh, A., R. Schiffelers, F. Kuypers, S. Larkin, G. Gildengorin *et al.* 2015 Microparticles as biomarkers of osteonecrosis of the hip in sickle cell disease. **Br.J.Haematol.** **168**: 135-138.

- Menell, J. S., G. M. Cesarman, A. T. Jacovina, M. A. McLaughlin, E. A. Lev *et al.* 1999 Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. **N.Engl.J.Med.** **340**: 994-1004.
- Milner, P. F., A. P. Kraus, J. I. Sebes, L. A. Sleeper, K. A. Dukes *et al.* 1991 Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. **N.Engl.J.Med.** **325**: 1476-1481.
- Minniti, C. P., J. Eckman, P. Sebastiani, M. H. Steinberg, and S. K. Ballas, 2010 Leg ulcers in sickle cell disease. **Am.J.Hematol.** **85**: 831-833.
- Montague, D. K., and K. W. Angermeier, 2006 Corporeal excavation: new technique for penile prosthesis implantation in men with severe corporeal fibrosis. **Urology** **67**: 1072-1075.
- Montague, D. K., J. Jarow, G. A. Broderick, R. R. Dmochowski, J. P. Heaton *et al.* 2003 American Urological Association guideline on the management of priapism. **J.Urol.** **170**: 1318-1324.
- Morrison, B. F., and A. L. Burnett, 2011 Priapism in hematological and coagulative disorders: an update. **Nat.Rev.Urol.** **8**: 223-230.
- Ngo, D., and M. Steinberg, 2014 Hematology clinic. Sickle cell disease. **Hematology.** **19**: 244-245.
- Nishank, S. S., M. P. Singh, and R. Yadav, 2013 Clinical impact of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations among sickle cell disease patients of Central India. **Eur.J.Haematol.** **91**: 462-466.
- Nolan, V. G., A. Adewoye, C. Baldwin, L. Wang, Q. Ma *et al.* 2006 Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. **Br.J.Haematol.** **133**: 570-578.
- Pandey, S., R. M. Mishra, and R. Saxena, 2012a Osteonecrosis and leg ulceration in Indian sickle cell patients. **Indian J.Pediatr.** **79**: 1246.
- Pandey, S., R. Ranjan, S. Pandey, R. M. Mishra, T. Seth *et al.* 2012b Effect of ANXA2 gene single nucleotide polymorphism (SNP) on the development of osteonecrosis in Indian sickle cell patient: a PCR-RFLP approach. **Indian J.Exp.Biol.** **50**: 455-458.
- Patrinos, G. P., P. Samperi, N. L. Lo, P. Kollia, G. Schiliro *et al.* 2005 Evidence for the molecular heterogeneity of sickle cell anemia chromosomes bearing the betaS/Benin haplotype. **Am.J.Hematol.** **80**: 79-80.
- Picot, J., C. Goudot, J. Berkenou, F. Galacteros, Y. Colin *et al.* 2014 Flow cytometry analyses reveal association between Lu/BCAM adhesion molecule and osteonecrosis in sickle cell disease. **Am.J.Hematol.** **89**: 115-117.
- Platt, O. S., 2008 Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N.Engl.J.Med.** **358**: 1362-1369.

Powars, D. R., 1991 Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol.Oncol.Clin.North Am.** **5**: 475-493.

Powars, D. R., L. S. Chan, A. Hiti, E. Ramicone, and C. Johnson, 2005 Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. **Medicine (Baltimore)** **84**: 363-376.

Psifidi, A., C. I. Dovas, G. Bramis, T. Lazou, C. L. Russel *et al.* 2015 Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. **PLoS.One.** **10**: e0115960.

Rahgozar, S., A. A. Poorfathollah, A. R. Moafi, and J. M. Old, 2000 Beta s gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **Am.J.Hematol.** **65**: 192-195.

Rand, J. H., 1999 "Annexinopathies"--a new class of diseases. **N.Engl.J.Med.** **340**: 1035-1036.

Rego, M. J., R. R. da Silva, M. C. Pereira, A. A. da Silva, I. R. Pitta *et al.* 2015 Evaluation of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cell populations, IL-10 production, and their correlation with clinical and biochemical parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. **Cytokine** **75**: 310-315.

Romana, M., L. Keclard, A. Froger, E. Lavocat, C. Saint-Martin *et al.* 2000 Diverse genetic mechanisms operate to generate atypical betaS haplotypes in the population of Guadeloupe. **Hemoglobin** **24**: 77-87.

Rusanova, I., G. Cossio, B. Moreno, P. F. Javier, R. G. De Borace *et al.* 2011 beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell patients from Panama. **Am.J.Hum.Biol.** **23**: 377-380.

Sankaran, V. G., and M. J. Weiss, 2015 Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nat.Med.** **21**: 221-230.

Sebastiani, P., M. F. Ramoni, V. Nolan, C. T. Baldwin, and M. H. Steinberg, 2005 Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **Nat.Genet.** **37**: 435-440.

Silva, I. V., A. F. Reis, M. J. Palare, A. Ferrao, T. Rodrigues *et al.* 2015 Sickle cell disease in children: chronic complications and search of predictive factors for adverse outcomes. **Eur.J.Haematol.** **94**: 157-161.

Soares, A. C., I. C. Samico, A. S. Araujo, M. A. Bezerra, and B. L. Hatzlhofer, 2014 Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Rev.Bras.Hematol.Hemoter.** **36**: 250-255.

Sonati, M. F., and F. F. Costa, 2008 The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J.Pediatr.(Rio J.)** **84**: S40-S51.

Steinberg, M. H., 2005 Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br.J.Haematol.* **129**: 465-481.

Steinberg, M. H., 2008 Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* **8**: 1295-1324.

Steinberg, M. H., H. Hsu, R. L. Nagel, P. F. Milner, J. G. Adams *et al.* 1995 Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *Am.J.Hematol.* **48**: 175-181.

Steinberg, M. H., and P. Sebastiani, 2012 Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am.J.Hematol.* **87**: 795-803.

Stram, D. O., 2004 Tag SNP selection for association studies. *Genet.Epidemiol.* **27**: 365-374.

Sutton, M., E. E. Bouhassira, and R. L. Nagel, 1989 Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. *Am.J.Hematol.* **32**: 66-69.

Thein, S. L., 2013 Genetic association studies in beta-hemoglobinopathies. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* **2013**: 354-361.

Ulug, P., N. Vasavda, M. Awogbade, J. Cunningham, S. Menzel *et al.* 2009 Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. *Ann.Hematol.* **88**: 803-805.

van de Graaf, S. F., J. G. Hoenderop, D. Gkika, D. Lamers, J. Prenen *et al.* 2003 Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* **22**: 1478-1487.

Vichinsky, E. P., L. A. Styles, L. H. Colangelo, E. C. Wright, O. Castro *et al.* 1997 Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* **89**: 1787-1792.

Ware, R. E., 2015 Optimizing hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* **2015**: 436-443.

Ware, R. E., B. R. Davis, W. H. Schultz, R. C. Brown, B. Aygun *et al.* 2015 Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* .

Worrall, D., K. Smith-Whitley, and L. Wells, 2015 Hemoglobin to Hematocrit Ratio: The Strongest Predictor of Femoral Head Osteonecrosis in Children With Sickle Cell Disease. *J.Pediatr.Orthop.*

Zhou, Z., M. Behymer, and P. Guchhait, 2011 Role of extracellular hemoglobin in thrombosis and vascular occlusion in patients with sickle cell anemia. *Anemia.* 2011: 918916.

Zhu, H., X. Fan, Z. Yu, J. Liu, Y. Murata *et al.* 2010 Annexin A2 combined with low-dose tPA improves thrombolytic therapy in a rat model of focal embolic stroke. **J.Cereb.Blood Flow Metab** 30: 1137-1146.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

MAIORES DE 18 ANOS

(resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário(a), da pesquisa "Avaliação do gene da Anexina A2 nas manifestações clínicas da anemia falciforme", que está sob a responsabilidade do pesquisador Diego Antonio Pereira Martins (Endereço: Rua da Palma, nº 575, apto. 404, São José, Recife, PE, CEP: 50020-040 – Fone: (81) 9617-5545 – E-mail: diego.martinsjr@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 9800-8105 - macbezerra@bol.com.br). Também participam também desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 9976-5136 - aderson@hotmail.com.br), Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo ((16) 9159-4676 - araujoarl@hotmail.com), Dr. Magnun Nueldo Nunes dos Santos ((19) 9255-8750 - nunes_biom@hotmail.com)

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

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce das principais manifestações clínicas da doença, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

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

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

(assinatura do pesquisador)

APÊNDICE B

Avaliação do gene da Anexina A2 nas manifestações clínicas da anemia falciforme.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo "Avaliação do gene da Anexina A2 nas manifestações clínicas da anemia falciforme", como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data

Assinatura do participante



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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO RESPONSÁVEIS PELOS MENORES DE 18 ANOS (resolução 466/12)

Convidamos o(a) seu/sua filho(a) ou menor de idade que está sob sua responsabilidade para participar, como voluntário(a), da pesquisa "Avaliação do gene da Anexina A2 nas manifestações clínicas da anemia falciforme", que está sob a responsabilidade do pesquisador Diego Antonio Pereira Martins (Endereço: Rua da Palma, nº 575, apto. 404, São José, Recife, PE, CEP: 50020-040 – Fone: (81) 9617-5545 – E-mail: diego.martinsjr@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 9800-8105 - macbezerra@bol.com.br). Também participam também desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ((81) 9976-5136 - aderson@hotlink.com.br), Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo ((16) 9159-4676 - araujoarl@hotmail.com), Dr. Magnun Nueldo Nunes dos Santos ((19) 9255-8750 - nunes_biom@hotmail.com)

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

Nós verificamos que a anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera os glóbulos vermelhos e que provoca dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Não estão previstos benefícios diretos para o paciente, entretanto, como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce das principais manifestações clínicas, levando a melhoria do serviço prestado e ao aumento da qualidade de vida dos pacientes. Dessa forma, gostaríamos que seu/sua filho(a) doasse 5 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. O risco por nós avaliado para o paciente é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha.

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

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

(assinatura do pesquisador)

APÊNDICE D

Avaliação do gene da Anexina A2 nas manifestações clínicas da anemia falciforme

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

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável pelo(a) menor _____, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, autorizo a sua participação no estudo "Avaliação do gene da Anexina A2 nas manifestações clínicas da anemia falciforme", como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele(a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade para mim ou para meu/minha filho(a).

Local e data

Assinatura do(a) responsável legal



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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE E

Tabela suplementar I. Comparação dos achados clínico-laboratoriais de pacientes com AF de acordo com o polimorfismo IVS-14-1046 C→T.

88

Modelo recessivo de herança genética								
Características dos pacientes	Todos os pacientes (n = 714)		Homozigoto mutado (TT) (n = 88)		Homozigoto selvagem + heterozigoto (CC + CT) (n = 350)		OR (IC 95%)	P-valor (†)
	No.	%	No.	%	No.	%		
Gênero								0.905
Masculino	347	48,6	42	47,7	172	49,1	1 (Ref.)	
Feminino	367	51,4	46	52,3	178	50,9	1.058 (0.663-1.69)	
Idade (anos), mediana	25		30		30			
Intervalo	3 – 61		10 – 59		7 – 61			
Idade (anos), categórica								
<18 anos	194	27,2	11	12,5	33	9,4		
Entre 18 e 40 anos	422	59,1	61	69,3	242	69,1		
>40 anos	98	13,7	16	18,2	75	21,4		
Sobrevida								0.565
Sim	665	95	79	94	327	95,6	1 (Ref.)	
Não	35	5	5	6	15	4,4	1.38 (0.487-3.91)	
Hidroxiuréia								
Sim	328	45,9	48	54,5	190	54,3		
Não	386	54,1	40	45,5	160	45,7		
Presença de alfa-talassemia (**)								1.000
Normal	539	76,2	69	78,4	273	78	1 (Ref.)	
Mutado	168	23,8	19	21,6	77	22	0.976 (0.554-1.722)	
Haplótipo β ^s								0.229
CAR/CAR	399	56,5	56	63,6	197	56,3	1 (Ref.)	
Não CAR/CAR	307	43,5	32	36,4	153	43,7	1.359 (0.839-2.203)	
HbF (%), mediana	7,1		6,8		5,95			0.488
Intervalo	0,5 – 28,5		1 – 20,7		0,5 – 26			
Contagem de hemácias (x10 ¹² /l), mediana	2,53		2,51		2,55			0.568
Intervalo	1,29 – 4,68		1,5 – 3,63		1,29 – 4,68			
Hemoglobina (g/dl), mediana	7,7		7,7		7,8			0.784
Intervalo	4,2 – 11,6		5,1 – 9,9		4,2 – 11,2			
Hematócrito (%), mediana	23,3		23,7		23,6			0.601
Intervalo	12,1 – 35,1		14,8 – 31,2		12,1 – 35,1			
VCM (fL), mediana	91,8		92,8		93,3			0.830
Intervalo	62,6 – 137,3		66,9 – 114,2		62,6 – 121,7			
HCM (g/dl), mediana	30,7		31,1		30,9			0.713
Intervalo	19,8 – 46,4		21,2 – 39,3		20,4 – 40,9			
Contagem de leucócitos (x10 ⁶ /l), mediana	12,1		11,6		12,05			0.493
Intervalo	4,2 – 34,1		4,5 – 32		4,2 – 34,1			
Contagem de plaquetas (x10 ⁹ /l), mediana	416		373		405			0.073
Intervalo	115,7 – 1016		130 – 1016		115,7 – 814			
Contagem de reticulócitos (%), mediana	9,6		9,6		9,8			0.268
Intervalo	0,4 – 29,2		1,3 – 20		0,5 – 29,2			
AST (U/L), mediana	43		40		42,5			0.116

Intervalo	11 – 235		16 – 151		11 – 235			
Lactato desidrogenase (U/L), mediana	838		800,5		832			0.437
Intervalo	192 – 3692		279 – 3188		192 – 3692			
Bilirrubina total (mg/dL), mediana	2,81		2,74		2,95			0.488
Intervalo	0,07 – 37,02		0,07 – 13,62		0,21 – 37,02			
Bilirrubina indireta (mg/dL), mediana	2,12		2,04		2,22			0.469
Intervalo	0,07 – 36,19		0,04 – 12,78		0,13 – 36,19			
Número de CVO's por ano, no último ano								0.712
0-2	385	53,9	43	48,9	162	46,3		
3-5	272	38,1	38	43,2	150	42,9		
>6	57	8	7	8	38	10,9		
Complicações da Anemia falciforme								
Colelitíase								1.000
Sim	409	68,5	58	65,9	229	68,8	1 (Ref.)	
Não	188	31,5	27	30,7	104	31,2	0.976 (0.585-1.628)	
Síndrome torácica aguda								0.536
Sim	82	38	14	46,7	45	39,2	1 (Ref.)	
Não	134	62	16	53,3	68	60,2	1.322 (0.588-2.973)	
Úlceras de perna								0.728
Sim	143	51,6	27	62,8	96	58,5	1 (Ref.)	
Não	134	48,4	16	37,2	68	41,5	1.195 (0.598-2.388)	
Osteonecrose								0.842
Sim	84	38,5	15	48,4	57	45,6	1 (Ref.)	
Não	134	61,5	16	51,6	68	54,4	1.118 (0.509-2.458)	
Acidente vascular cerebral (AVC)								0.540
Sim	70	34,3	15	48,4	47	40,9	1 (Ref.)	
Não	134	65,7	16	51,6	68	59,1	1.356 (0.612-3.008)	
Faixa de risco para AVC								1.000
Sim	62	31,6	7	30,4	31	31,3	1 (Ref.)	
Não	134	68,4	16	69,6	68	68,7	0.96 (0.359-2.569)	
Priapismo								0.562
Sim	97	67,8	12	66,7	71	74,7	1 (Ref.)	
Não	46	32,2	6	33,3	24	25,3	0.676 (0.229-1.998)	

CAR, República centro-africana; HbF, Hemoglobina fetal; VCM, Volume corpuscular médio; HCM, Hemoglobina corpuscular média; AST, Aspartato aminotransferase; CVO, Crises vaso-oclusivas; AVC, Acidente vascular cerebral;

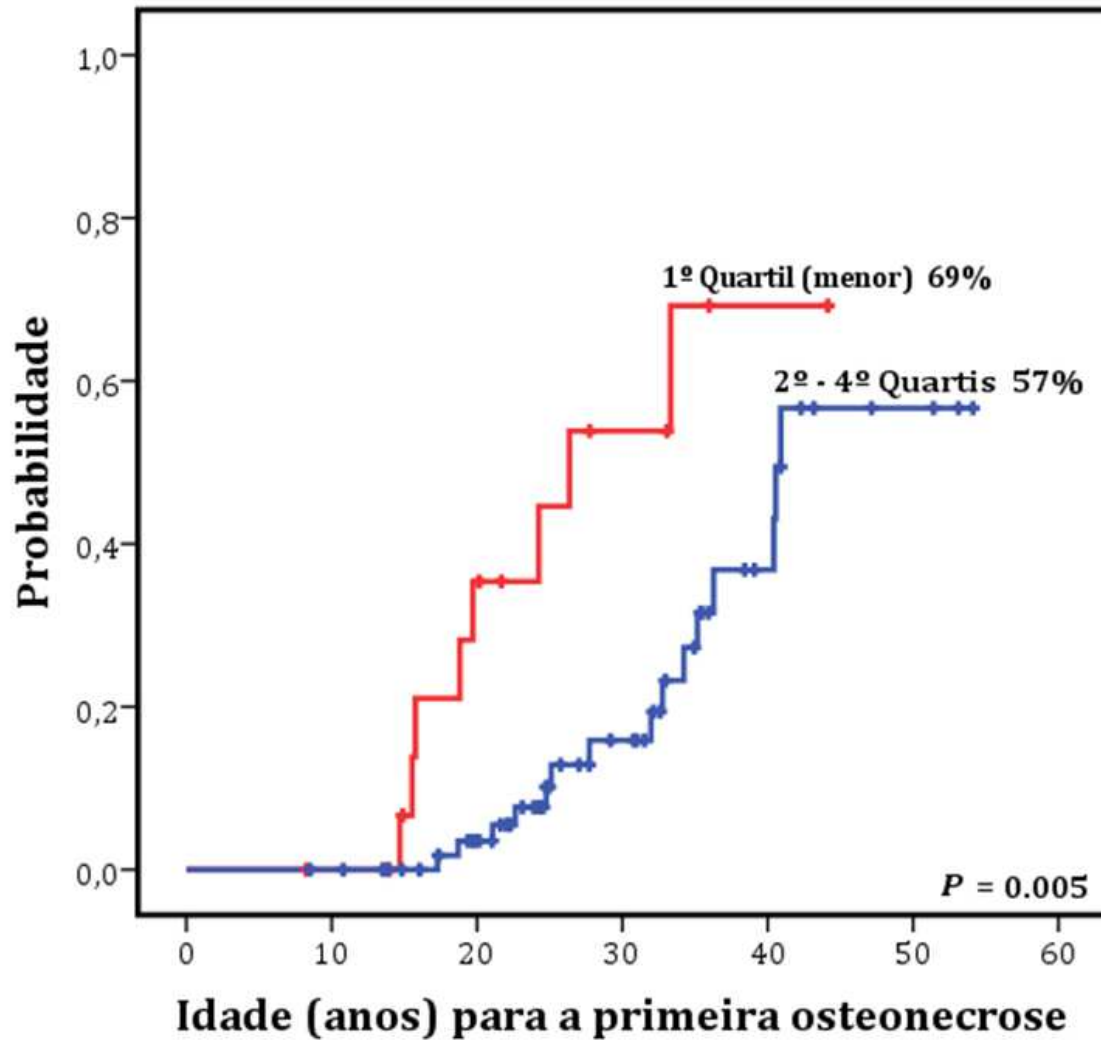
*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$);

**Presença do traço da alfa (α)-talassemia: deleção -3.7kb (- α 3.7);

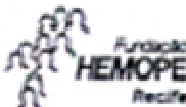
†Valores não disponíveis foram excluídos para o cálculo do *P-valor*.

APÊNDICE F

Figura suplementar I. Probabilidade de desenvolvimento de osteonecrose dependente do valor categórico da expressão relativa de *ANXA2*, mostrando que pacientes com menores níveis de *ANXA2* apresentam maior taxa de desenvolvimento da osteonecrose.



ANEXO A

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171 - Graças Recife-PE CEP: 52011-000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 E-eletrônico: cep.hemope@gmail.com	 Governador do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	---	---

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL : Nº. 035/2010

Título do Projeto: Moduladores genéticos das manifestações clínicas da anemia falciforme

Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Pesquisador: Marcos André Cavalcanti Bezerra, Ph.D.

Identidade: 5067375 CPF: 987.061.525-20 Telefone: 81 - 3182-4711

Endereço: Rua, Antonio Celso Uchôa Cavalcanti- Graças- Recife - PE - CEP: 52050-002

Local de Desenvolvimento do Projeto: Hospital de Hematologia da Fundação Hemope- UNILABE

Finalidade: Auxílio a projetos de pesquisa Edital FACEPE 10/010.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

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

Objetivos Específicos: Determinar a co-herança de α_1^{+36} talassemia e da triplicação do α (aaa) influenciando nas manifestações clínicas do acidente vascular cerebral e priapismo na anemia falciforme; Relacionar os níveis de HbFetal e genótipos dos Haplótipos β^+ com o episódio de priapismo e acidente vascular cerebral; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene da eNOS (T-386C) no desenvolvimento do priapismo em pacientes com anemia falciforme; Investigar se a associação de SNPs no gene Kttn podem ser um fator de risco nas complicações vasculares, como priapismo, em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do polimorfismo na região promotora do gene TNF- α (-308) no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs2258088 (T->G), localizado na região codificadora do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Investigar a associação do SNPs rs3093665 (C->A), localizado na região 3' não transcrita do gene TNF- α no desenvolvimento do AVC em pacientes com anemia falciforme; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre pacientes portadores de anemia falciforme com e sem priapismo; Comparar e relacionar os níveis de hemoglobina total, Hb S, Hb F e reticulócitos entre os pacientes portadores de anemia falciforme com e sem AVC; Compreender melhor a heterogeneidade clínica da doença falciforme nas complicações do sistema nervoso central e Compreender melhor a heterogeneidade da doença falciforme nas complicações clínicas do priapismo.

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

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

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

Homologado na Reunião do CEP de 26/10/2010

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