



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

RODRIGO MARCIONILO DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA-221 E DO miRNA-126 COM O
DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA
FALCIFORME**

Recife

2019

RODRIGO MARCIONILO DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA-221 E DO miRNA-126 COM O
DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES 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.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Coorientador: Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santana, Rodrigo Marcionilo de

Avaliação da expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 com o desenvolvimento de manifestações clínicas da anemia falciforme / Rodrigo Marcionilo de Santana - 2019.

69 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientadores: Antonio Roberto Lucena de Araujo

Luydson Richardson Silva Vasconcelos

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

Inclui referências e anexos.

1. Anemia falciforme 2. Vaso-oclusão 3. Expressão gênica

I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (Orientador) II. Araújo, Antonio Roberto Lucena de (Coorientador) III. Vasconcelos, Luydson Richardson Silva (Coorientador) IV. Título

616.152 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-185

RODRIGO MARCIONILO DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA-221 E DO miRNA-126 COM O
DESENVOLVIMENTO DE MANIFESTAÇÕES 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.

Aprovada em: 27/08/2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Paula Sandrin Garcia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael Lima Guimarães (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Igor de Farias Domingos (Examinador Externo)
Hospital Correia Picanço

Dedico este trabalho a vocês que sempre acreditaram em mim e sempre estiveram ao meu lado em todo o momento, meus pais e tias (Luiza, Marcos, Iracema e Mineia) e também ao meu pai (Marcelo) que não teve a oportunidade de me ver chegar onde estou agora. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me abençoar diariamente, por me dar forças para seguir em frente e me ajudar nas conquistas dos meus objetivos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no seu laboratório, por acreditar no meu potencial e sempre estar me incentivando pra conseguir o melhor. Por todas as conversas, todo aprendizado que me forneceu durante esses anos que estou no laboratório. Por compartilhar sua experiência profissional e pessoal comigo, me permitindo amadurecer como pessoa e profissional. Muito obrigado;

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo, por toda ajuda e por todo conhecimento transmitido, por todas as conversas e orientações essenciais a esse trabalho e à minha formação, e Prof. Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos, por ser tão receptivo e solícito, disponibilizando o seu laboratório para concluirmos os experimentos desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos;

Às minhas três mães, Luiza, Iracema e Mineia, e ao meu pai, Marcos, que sempre me deram amor, apoio, incentivo e exemplo durante todos os momentos da minha vida, por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, sempre lutaram comigo pelo meu sucesso. Sem vocês não conseguiria chegar tão longe, amo muito vocês;

Às minhas primas, Lenilda e Clara, que sempre estiveram comigo, sempre me incentivando em minhas lutas e conquistas. Às minhas avós, minhas tias, e aos meus familiares;

Às minhas grandes amigas, Marilia, Pryscilla, Renata, Ruanne e Thuanny, por sempre estar comigo em todos os momentos da faculdade, por serem compreensivas, por ficarem felizes com as minhas conquistas, por acreditarem no meu potencial e por toda ajuda. Amo vocês, saibam que carregarei vocês sempre no meu coração;

Aos meus amigos de longa data, Nalvinha, Rebeca, Marcos e Tairine, por estarem comigo a tanto tempo, sempre me ajudando, pelo apoio, pela amizade,

embora muitas vezes não estando juntos fisicamente, eu sempre soube que no momento que eu precisar vocês estarão lá para me ajudar. Amo vocês;

Aos amigos formados no LabCen, Thais, Marcondes e Arcanjo, por compartilhar todos os momentos comigo, que até quando os experimentos davam errado estavam lá pra rir da situação e descontraír. Aos amigos do grupo “mediocrezinhos”, que foi nosso escape dos estresses do laboratório. A Diego, Peu e Igor que me ajudaram no desenvolvimento do meu projeto, por compartilhar seus conhecimentos comigo e sempre estarem dispostos a ajudar. E a todos do NHCL;

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pelo conhecimento e espaço cedido para o desenvolvimento da pesquisa. À Fundação HEMOPE, em especial aos pacientes, por fornecerem as amostras, e ao pessoal da coleta (Glauce, Ircilla e Jo) por serem tão receptivos e prestativos, sempre dispostos a ajudar;

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido durante meu o meu mestrado;

E a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigado.

“Atreva-se a pensar. Antes que seus sonhos sejam realizados, nunca estabeleça limites, nunca se dê nenhuma desculpa para retrair, qualquer justificativa para o fracasso. Somente assim, temos a chance de tirar esses sonhos aparentemente distantes e transformá-los em realidade genuína”

(Mao Ni)

RESUMO

A vaso-oclusão é uma das principais causas de morbidade em pacientes com anemia falciforme (AF). A expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), tem um papel importante neste processo. microRNAs (miRNAs) circulantes são biomarcadores promissores no diagnóstico e prognóstico de várias condições patológicas, por sua função na regulação da expressão gênica. Estudos indicaram que o miRNA-221 é capaz de regular a expressão de ICAM-1 e o miRNA-126 regula VCAM-1. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é investigar a associação entre os níveis de expressão do miR-221 e miR-126 com as manifestações clínicas em pacientes com AF. No presente trabalho foram analisados 81 pacientes que foram separados em um grupo caso (n=53), que apresentaram manifestações clínicas da doença, grupo controle HbSS (n=18), sem as principais complicações, e o grupo de indivíduos saudáveis (HbAA)(n=10). Para a avaliação da expressão dos miRNAs foi feita uma reação de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real quantitativa utilizando um sistema TaqMan®. Os resultados mostraram que houve diferença significativa da expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 entre os grupos estudados. Assim como, houve uma maior expressão do miR-221 ($p=0,0001$) e miR-126 ($p=0,0008$) em pacientes que desenvolveram úlcera maleolar em comparação com os que não apresentaram essa manifestação. Dessa forma, podemos perceber que os níveis elevados desses miRNAs podem estar relacionados com o desenvolvimento dessa complicação clínica nesses pacientes.

Palavras-chave: Anemia falciforme. vaso-oclusão. miRNA-221. miRNA-126.

ABSTRACT

Vaso-occlusion is a major cause of morbidity in patients with sickle cell anemia (SCA). Expression of adhesion molecules, such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), plays an important role in this process. Circulating microRNAs (miRNAs) are promising biomarkers in the diagnosis and prognosis of various pathological conditions for their role in the regulation of gene expression. Studies have indicated that miRNA-221 is able to regulate ICAM-1 expression and miRNA-126 regulates VCAM-1. Thus, the objective of this work is to investigate the association between miR-221 and miR-126 expression levels with clinical manifestations in patients with AF. The present study analyzed 81 patients who were separated in a case group (n=53), who presented clinical manifestations of the disease, control group (n=18) without major complications, and the group of healthy individuals (HbAA) (n=10). For the evaluation of miRNA expression, a reverse transcription reaction was performed followed by quantitative real-time PCR using a TaqMan® system. The results showed that there was a significant difference in the expression of miRNA-221 and miRNA-126 among the studied groups. Similarly, there was a greater expression of miR-221 ($p = 0.0001$) and miR-126 ($p = 0.0008$) in patients who developed malleolar ulcer compared to those who did not. Thus, we can see that the higher levels of these miRNAs may be related to the development of this clinical complication in these patients.

Keywords: Sickle cell anemia. vaso-occlusion. miRNA-221. miRNA-126.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Número de crianças nascidas com Anemia Falciforme no mundo.....	18
Figura 2 –	Alteração da membrana da hemácia pela polimerização da HbS.....	20
Figura 3 –	Fisiopatologia da anemia falciforme.....	22
Figura 4 –	Variantes de VCAM-1 derivados do <i>splicing</i>	24
Figura 5 –	Estrutura da ICAM-1.....	26
Figura 6 –	Biogênese dos microRNAs.....	32
Figura 7 –	Expressão relativa do miR-126.....	43
Figura 8 –	Expressão relativa do miR-221.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Complicações clínicas apresentadas por pacientes com a Anemia Falciforme.....	27
Tabela 2 –	Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo.....	41
Tabela 3 –	Caracterização clínica e demográfica dos pacientes incluídos no estudo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente Vascular Cerebral
C	Citosina
CAM	Do inglês, <i>cell adhesion molecules</i>
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CVO	Crises Vaso-oclusivas
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTC	Doppler Transcraniano
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
G	Guanina
Glu	Ácido Glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA2	Hemoglobina A2
<i>HBB</i>	Gene da Hemoglobina Subunidade Beta
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HEMOPE	Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
ICAM-1	Do inglês, <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IL	Interleucina
miRNA	MicroRNA
NO	Do inglês, <i>Nitric Oxide</i>
NF-Kb	Do inglês, <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
p	Braço curto do cromossomo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
q	Braço longo do cromossomo
RNA	Ácido Ribonucleico

RT-qPCR	Do inglês, Real time <i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alfa</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Val	Valina
VCAM-1	Do inglês, <i>Vascular Cell Adhesion 1</i>
α	Alfa
β	Beta
ml	Mililitro
ng	Nanograma
μ L	Microlitro
μ g	Micrograma
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
%	Porcentagem
=	Igual a
>	Maior que
<	Menor que

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	ANEMIA FALCIFORME.....	18
2.1.1	Epidemiologia.....	18
2.1.2	Fisiopatologia.....	19
2.1.3	Moléculas de Adesão.....	23
2.1.3.1	VCAM-1.....	23
2.1.3.2	ICAM-1.....	25
2.1.4	Complicações clínicas.....	26
2.2	MICRORNAS.....	30
2.2.1	miRNA-221.....	34
2.2.2	miRNA-126.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	CASUÍSTICA.....	37
3.2	DESENHO DO ESTUDO.....	38
3.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	38
3.4	ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA.....	38
3.5	ANÁLISE MOLECULAR.....	39
3.5.1	Extração dos microRNAs.....	39

3.5.2	Análise da expressão dos microRNAs.....	39
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES.....	41
4.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-126.....	42
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-221.....	43
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	62
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	63
	CURRICULUM VITAE (LATTES).....	66

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma anemia hemolítica caracterizada por quadro inflamatório crônico, que ocorre por homozigose de uma mutação no gene da globina β , resultando na formação de uma hemoglobina mutante, a hemoglobina S (HbS). Em condições de hipóxia, a HbS polimeriza e precipita, causando alterações morfológicas na hemácia. Um complexo conjunto de eventos, como a inflamação, adesão dos leucócitos e eritrócitos falciformes ao endotélio vascular podem levar à obstrução dos vasos sanguíneos e subsequente dano aos tecidos, contribuindo para a fisiopatologia da AF.

A interação da hemácia falciforme com o endotélio vascular produz radicais de oxigênio pelas células endoteliais e também resulta na ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de vários genes na superfície do endotélio. Destes estão inclusos os genes que codificam moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Além disso, os níveis plasmáticos dessas proteínas aumentam com a permanência da ativação endotelial, favorecendo uma maior interação dos leucócitos com o endotélio.

A expressão dessas moléculas de adesão tem um importante papel no processo de vaso-oclusão e consequentemente em um maior risco de complicações graves da AF, portanto a pesquisa por marcadores envolvidos no mecanismo de regulação da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 é bem significativa.

As complicações graves da AF são de difícil prognóstico e, uma vez que os médicos esperam o aparecimento destas para dar início ao tratamento, muitos estudos buscam métodos para prevê-las. Dentre os possíveis marcadores, estão os microRNAs (miRNAs), que são pequenas moléculas de RNA não codificante representando um novo mecanismo de regulação gênica. Os miRNAs controlam a expressão gênica mediante pareamento com locais alvo, parcialmente complementares, em regiões não traduzidas 3' (*3' untranslated regions*, UTR) do RNA mensageiro (mRNA), resultando na repressão da tradução e/ou desestabilização do mRNA.

As concentrações de miRNAs circulantes diferem de acordo com os estados fisiológicos e patológicos, sugerindo que podem ser biomarcadores úteis para diagnóstico e prognóstico de várias doenças. Alguns miRNAs foram descritos sendo

capazes de regular a expressão de proteínas que estão relacionadas ao processo de adesão celular. A ICAM-1 é alvo de alguns miRNAs, como o miR-221 que é um importante regulador de processos inflamatórios. Do mesmo modo, miR-126, sendo um dos mais estudados miRNAs relacionados com a biologia vascular, controla a expressão da VCAM-1.

Dessa forma, indivíduos portadores da AF podem apresentar níveis diferenciados de expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 que regulam a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, respectivamente, e essa expressão diferenciada pode estar relacionada com o desenvolvimento das manifestações clínicas da AF.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre os níveis de expressão do miR-221 e miR-126 com as manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação HEMOPE.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Descrever os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com anemia falciforme acompanhados na Fundação HEMOPE;
2. Avaliar a expressão relativa dos miR-221 e miR-126 presente nas amostras dos pacientes portadores de anemia falciforme e em indivíduos saudáveis;
3. Verificar a associação da expressão dos miRNAs com a ocorrência das manifestações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme, correlacionando os dados obtidos com os achados clínicos dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Epidemiologia

A doença falciforme (DF), descrita inicialmente por Herrick em 1910, está presente em grande parte da população, onde aproximadamente 20 a 25 milhões de pessoas apresentam a mutação responsável pela doença (AKINGBOLA et al., 2015; HERRICK, 1910). As estimativas dos programas de triagem neonatal sugerem que aproximadamente 300.000 crianças nascem com a doença. Embora prevalente em todo o mundo devido à migração populacional, a AF é mais comum na África Sub-Saariana correspondendo a 2/3 desses nascimentos (Figura 1) (PIEL; STEINBERG; REES, 2017; PIETY et al., 2016).

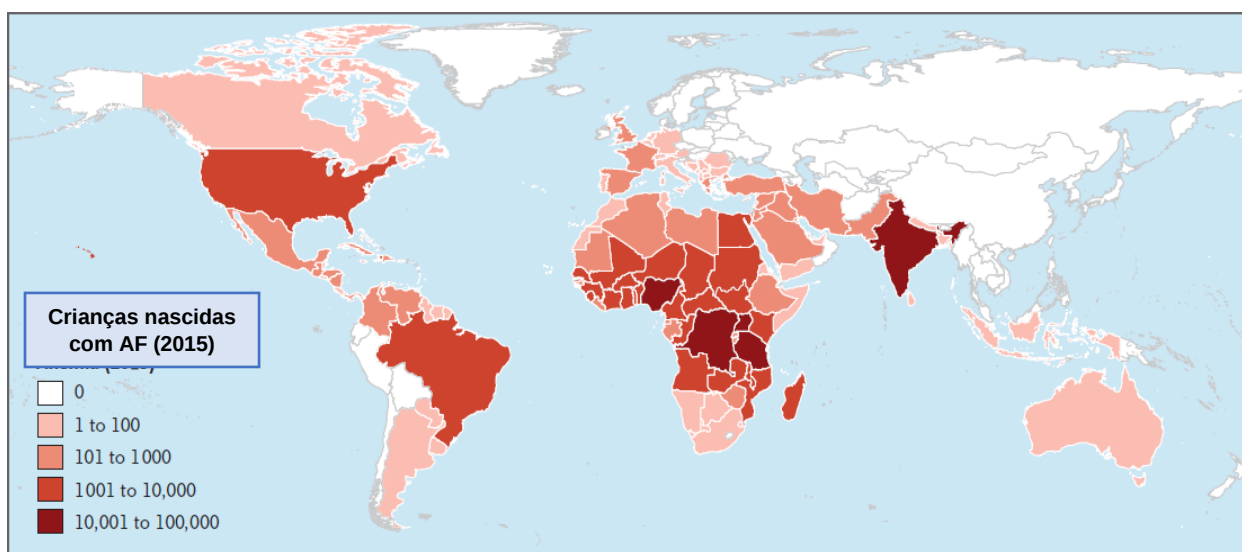


Figura 1: Número de crianças nascidas com Anemia Falciforme no mundo. Estimativas mostrando que a maioria desses nascimentos ocorrem na África e na Índia. Adaptado de (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

No Brasil, a sua distribuição é bem heterogênea afetando 25.000 a 30.000 pessoas, com maior incidência na população afrodescendente (SOARES et al., 2014). Dados do Ministério da Saúde mostram que aproximadamente 1000 crianças nascem com DF, apresentando uma incidência de 1 em cada 2700 recém-nascidos. Em Pernambuco, essa estimativa é de 1 em cada 1700 recém-nascidos (BRASIL, 2013). Devido à sua alta prevalência e mortalidade, o diagnóstico da AF passou a

ser obrigatório em todos os estados brasileiros pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal desde 2001 (FERRAZ; MURAO, 2007).

Embora a África ainda apresente uma alta taxa de mortalidade, nos países mais desenvolvidos a taxa de mortalidade diminuiu devido ao diagnóstico precoce e um tratamento abrangente, como o tratamento com hidroxiureia e transfusões sanguíneas recorrentes (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017).

2.1.2 Fisiopatologia

A anemia falciforme é causada por uma mutação pontual que acarreta na substituição de um nucleotídeo (GAG→GTG) no sexto códon do gene da globina β (*HBB*), o qual está localizado no cromossomo 11 (11p 15.15) (PAIKARI; SHEEHAN, 2017). Essa mutação leva à troca de um ácido glutâmico por valina na cadeia β globínica ($\beta\text{Glu}^6 \rightarrow \text{Val}^6$), resultando em uma variante hemoglobínica anormal, a hemoglobina S (HbS) (INGRAM, 1959; THEIN, 2017). Em condições de hipóxia, a HbS se organiza na forma de polímeros e danifica o eritrócito normal, causando alterações morfológicas na hemácia e resultando na falcização da mesma, sendo este processo primário indispensável na fisiopatologia da doença (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009).

A polimerização intracelular da molécula da HbS estica a forma bicôncava flexível normal da hemácia em uma forma rígida alongada. Em adição à mudança na forma do eritrócito, os polímeros também têm um impacto na membrana da célula, levando a uma exposição extracelular de proteínas e glicolípídeos que normalmente são encontrados dentro da célula (Figura 2) (FRENETTE; ATWEH, 2007; WARE et al., 2017). Essas mudanças nos componentes lipídicos e proteicos na membrana da hemácia falciforme alteram as interações da célula com os leucócitos, plaquetas e endotélio (AZAR; WONG, 2017).

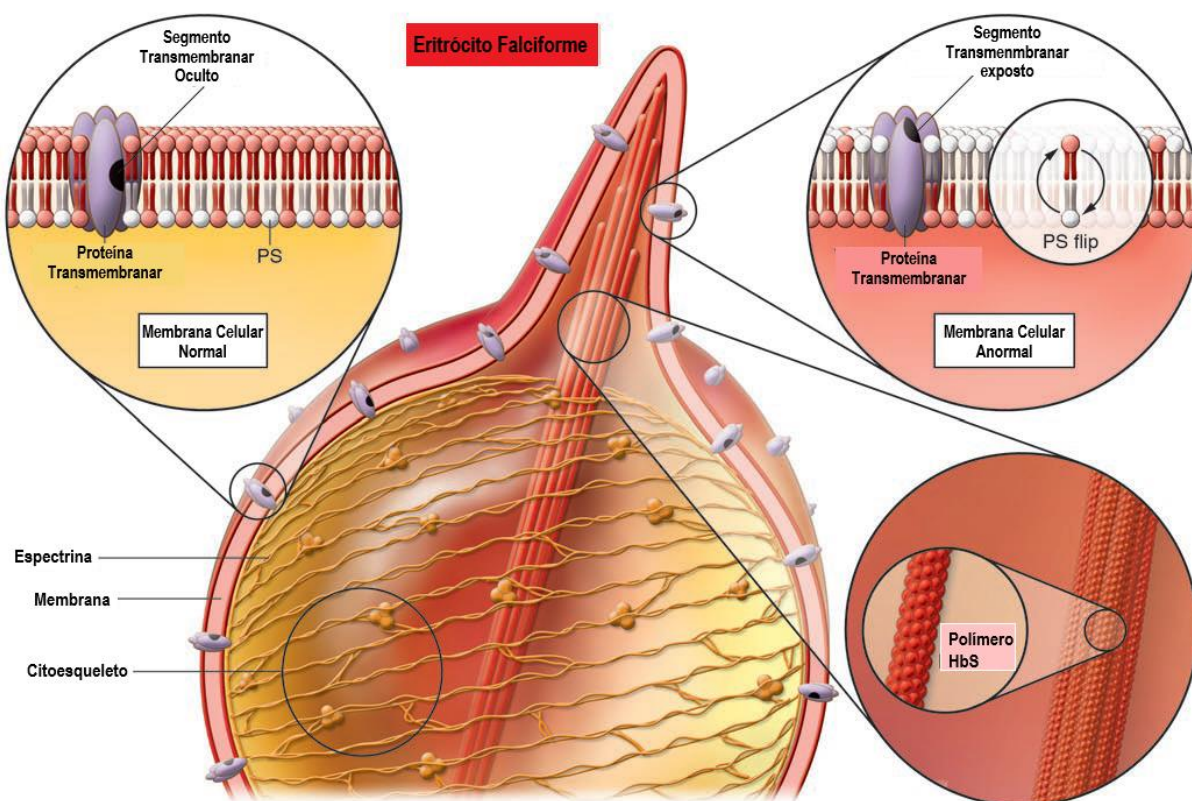


Figura 2: Alteração da membrana da hemácia pela polimerização da HbS. A desoxigenação da HbS induz uma alteração na conformação da cadeia B, levando à formação de um polímero de hemoglobina. Os polímeros interrompem o citoesqueleto da hemácia e formam protuberâncias, dando origem ao formato de foice. A interrupção da ligação da membrana ao citoesqueleto resulta na exposição de epítomos de proteínas transmembranar e das trocas lipídicas, notavelmente da fosfatidilserina (PS), entre o interior e o exterior da célula. Adaptado de (FRENETTE; ATWEH, 2007).

A formação de polímeros nas células após a desoxigenação ocorre em um período de tempo que é relacionado à concentração de HbS na hemácia, assim, as hemácias com alta concentração de hemoglobina S serão propensas à uma polimerização mais rápida (FERRONE, 2018). Outro fator envolvido neste processo é o tempo desses eritrócitos no trânsito capilar: se o tempo for prolongado a probabilidade de polimerização e consequente falcização é maior (KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009).

A polimerização resulta em alterações na morfologia e função da hemácia, propiciando uma redução do tempo de vida útil desta célula e pode levar à vaso-oclusão com consequente dano aos órgãos (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). Os eritrócitos falciformes também apresentam um aumento anormal de moléculas de adesão em sua superfície, com relação aos eritrócitos normais,

devido à exposição das proteínas do meio intracelular para o meio extracelular (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012). O processo de falcização da hemácia leva a uma cascata de eventos que promovem a vaso-oclusão, hemólise, liberação de citocinas e fatores inflamatórios (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017).

O acelerado grau de destruição das hemácias falciformes é uma das características da AF, diminuindo a vida útil dessas hemácias para 16-20 dias, tendo em vista o tempo de vida normal de 120 dias (THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017). A hemólise pode ocorrer no interior do vaso ou extra vascularmente. Aproximadamente um terço da destruição dos eritrócitos ocorre na forma intravascular, onde a hemoglobina presente no interior da célula é liberada no plasma (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Esse tipo de hemólise é causado pela falcização da hemácia, porém a fragilidade da hemácia ajuda no processo. A destruição extravascular das hemácias é mediada pelos macrófagos teciduais e baço, que reconhecem danos nas hemácias e as retiram da circulação. Ainda que em ambos os casos ocorra liberação de hemoglobina no plasma, a destruição intravascular tem maior contribuição nesse processo (HABARA; STEINBERG, 2016; KATO GJ, HEBBEL RP, STEINBERG MH, 2009).

Com a ocorrência da hemólise, há a liberação de hemoglobina e arginase, que interferem na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), produção de espécies reativas de oxigênio e inflamação intravascular (PICCIN et al., 2019). A hemoglobina livre no plasma interage com NO produzindo metahemoglobina, contribuindo com a depleção deste gás, que é um importante vasodilatador (TOLEDO et al., 2019). Além disso, a arginase liberada degrada a L-arginina causando redução da produção de óxido nítrico, impactando na sua função endotelial, levando a uma vasoconstrição (DUBERT et al., 2017; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

O estado inflamatório que ocorre em pacientes com AF é um mecanismo desencadeado pela falcização e constante danos ao endotélio (KELEKU-LUKWETE et al., 2015). As hemácias falciformes podem causar injúria ao endotélio vascular e, essas lesões, em conjunto com a hemólise intravascular, ativam as células com consequente liberação de mediadores inflamatórios como a endotelina-1, moléculas vasoconstritoras e pró-inflamatórias, além da ativação de fatores de transcrição (OWUSU-ANSAH et al., 2016).

Há um aumento no número de leucócitos na circulação, ativação de fatores da coagulação e maior expressão de moléculas de adesão celular, bem como o

aumento de seus níveis plasmáticos (TRAN; GUPTA; GUPTA, 2017). As interações adesivas entre as células endoteliais, hemácias, leucócitos e plaquetas induzem uma hiperativação celular, que vai promover um aumento na concentração de mediadores inflamatórios como as interleucinas (IL), IL-1, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral – α (TNF- α) no plasma (ANTWI-BOASIAKO et al., 2018). Portanto, um ciclo de ativação celular repetida, adesão celular e produção de moléculas inflamatórias acarreta em um quadro inflamatório crônico que tem um papel fundamental no processo de vaso-oclusão (ANSARI et al., 2017; DOS SANTOS; CHIN, 2012).

Os eventos vaso-oclusivos que ocorrem nos pacientes com AF são muito importantes para a fisiopatologia da doença. Este processo é bem complexo e envolve muitos mecanismos que estão altamente relacionados com a hemólise e inflamação (WONKAM et al., 2017). Os mecanismos incluem múltiplas interações entre as moléculas de adesão e os receptores nas hemácias, leucócitos, plaquetas e células endoteliais, nos quais as proteínas plasmáticas e componentes da matriz sub-endotelial formam pontes entre as células sanguíneas (Figura 3) (HOPPE et al., 2017; KEIKHAEI et al., 2013).

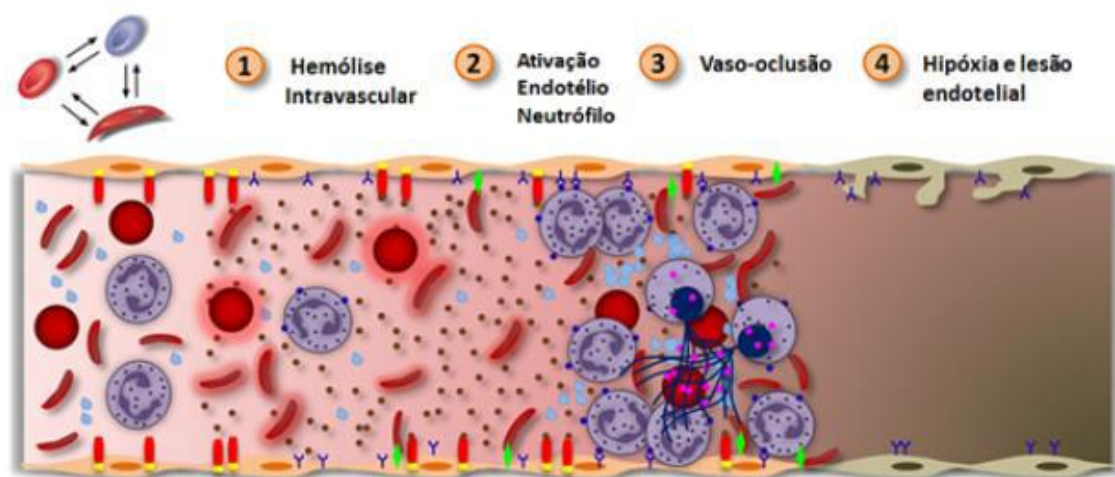


Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme. (1) Eritrócitos falcizados levam à hemólise intravascular, a qual libera hemoglobina livre (consequentemente, heme) e arginase no plasma. (2) O grupamento heme ativa neutrófilos e células endoteliais que induzem a expressão de moléculas de adesão. (3) A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

Eritrócitos podem se aderir ao endotélio diretamente, por intermédio de moléculas que podem formar pontes, ou com proteínas da matriz sub-endotelial. Assim como os eritrócitos, os leucócitos também apresentam um papel na vaso-oclusão por se aderirem ao endotélio (MORRONE et al., 2018). Com um aumento de mecanismos inflamatórios, ocorre o recrutamento de leucócitos e sua interação com as hemácias na microcirculação leva a um fluxo lento, aumento do tempo de trânsito, hipóxia e falcização. Dessa forma, esse aumento na contagem dos leucócitos é um fator de mau prognóstico para os pacientes (KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009).

A ativação crônica da coagulação é comumente observada em pacientes com AF, sendo evidenciado pelo aumento plasmático dos níveis dos marcadores de geração de trombina, como os fragmentos de protrombina e complexos trombina antitrombina, e ativação plaquetária (MBURU; ODAME, 2019). Mecanismos hemostáticos que contribuem para a hipercoagulabilidade inclui exposição de superfícies lipídicas, diminuição de proteínas anticoagulantes (Proteína C e Proteína S) e níveis aumentados do Fator de von Willebrand (FAES et al., 2019; NOUBOUOSSIE; KEY; ATAGA, 2016; SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017).

A adesão vascular é mediada pela expressão de moléculas de adesão celular (CAM, traduzido de *cell adhesion molecules*), como a VCAM-1 e ICAM-1, na superfície das células endoteliais, reticulócitos e leucócitos. O aumento das CAM é mediado por citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , por exemplo) e também por ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-Kb). A expressão e presença de altas concentrações de CAM plasmáticas demonstra estar relacionadas com a gravidade das crises vaso-oclusivas (ALAGBE et al., 2018; MONCHANIN et al., 2008).

2.1.3 Moléculas de Adesão

2.1.3.1 VCAM-1

A molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) é uma proteína transmembranar que faz parte da superfamília das imunoglobulinas, uma importante classe de receptores de adesão célula-célula (OLIVARES-SILVA et al., 2018). Esta

proteína é codificada pelo gene *VCAM1*, que está localizado no cromossomo 1p21.2 e é expresso predominantemente em células endoteliais. A VCAM-1 humana se apresenta em duas formas variantes resultantes do *splicing*, onde uma apresenta 7 domínios imunoglobulínicos (D1 a D7) e a outra apresenta 6 domínios, faltando o domínio 4 (Figura 4) (COOK-MILLS; MARCHESE; ABDALA-VALENCIA, 2011).

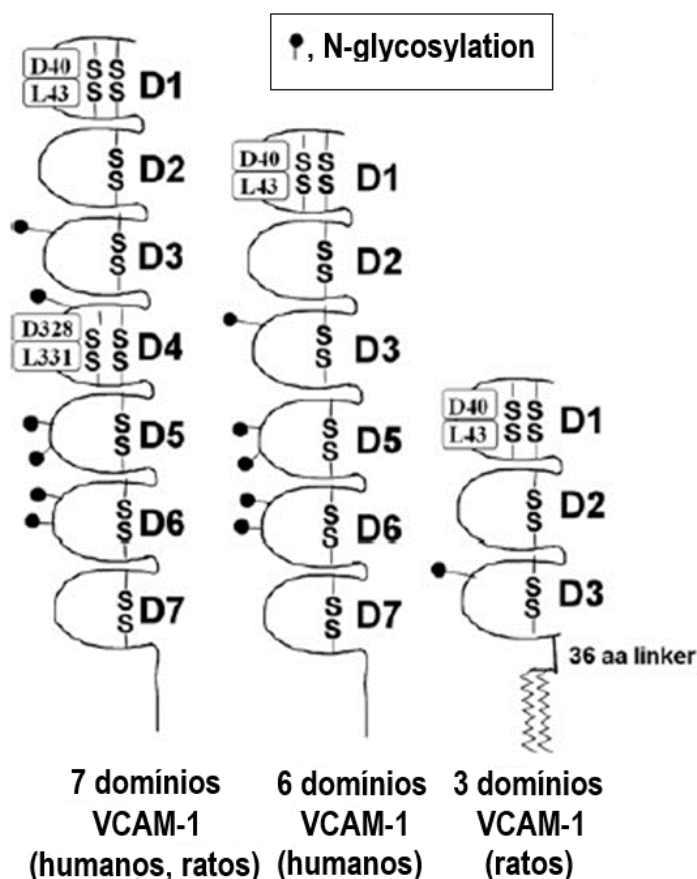


Figura 4: Variantes de VCAM-1 derivadas do *splicing*. A VCAM-1 humana apresenta duas variantes que apresentam 6 ou 7 domínios. A forma com 6 domínios, está ausente o domínio 4. Dentro da VCAM-1, o domínio 1 e 4 contêm o sítio de ligação para integrinas. Adaptado de (COOK-MILLS et al., 2011). D1-7: Domínios 1 a 7.

A expressão de VCAM-1 é ativada por citocinas pró-inflamatórias, incluindo $\text{TNF-}\alpha$, e também por espécies reativas de oxigênio (ROS), lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, alta concentração de glicose, agonista do TLR (*Toll-like receptors*) e estresse (KONG et al., 2018). Em altos níveis de inflamação e condições crônicas em algumas doenças, a VCAM-1 é expressa na superfície de outras células, que incluem macrófagos teciduais, células dendríticas, fibroblastos da

medula óssea, mioblastos, células de Sertoli e células cancerígenas (SHARMA et al., 2017).

Todas as variantes se ligam à integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, *very late antigen-4*) da subfamília $\beta 1$ das integrinas e esta proteína de membrana está associada com a adesão celular entre as células endoteliais e os leucócitos e com a transdução de sinais, apresentando um grande papel no recrutamento e infiltração de células nos sítios de injúria, no desenvolvimento de doenças inflamatórias e em mecanismos cancerígenos, como metástase e angiogênese do tumor (TERPOS et al., 2016; YU; JUN; SHIN, 2017). VCAM-1 também se liga a linfócitos e monócitos circulantes que expressam as integrinas $\alpha 4\beta 4$ e $\alpha 4\beta 7$ (OLIVARES-SILVA et al., 2018).

2.1.3.2 ICAM-1

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, também conhecida como CD54) é uma glicoproteína transmembranar da superfamília das imunoglobulinas que está presente em níveis basais em várias tipos celulares, porém é altamente expressa em resposta a estímulos inflamatórios, particularmente nas células endoteliais onde sua expressão se mantém em longos períodos de tempo (USAMI et al., 2013). ICAM-1 é expressa essencialmente em todos os leucócitos, células endoteliais, células da glia e outros (RAMOS; BULLARD; BARNUM, 2014). Na maioria dos tipos celulares e sob condições não inflamatórias, a expressão de ICAM-1 é constitutivamente baixa, geralmente detectável apenas nas células endoteliais, no entanto TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e outras citocinas induzem um aumento na sua expressão (HUA, 2013; YANG et al., 2019).

O gene codificante desta proteína está localizado no 19p13.2 e inclui 7 éxons e 6 íntrons. ICAM-1 consiste em 5 domínios imunoglobulínicos extracelulares, um domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática que se associa a múltiplas proteínas do citoesqueleto (Figura 5). ICAM-1 sofre *splicing* alternativo gerando pelo menos seis formas ligadas à membrana e uma forma solúvel (CHOU et al., 2015; RAMOS; BULLARD; BARNUM, 2014).

O domínio extracelular facilita a adesão célula-célula, se ligando à subunidade α das integrinas $\beta 2$ e fibrinogênio; e o domínio citoplasmático pode ativar vias de

transdução de sinais, através da interação com um adaptador e outras proteínas do citoesqueleto (GOH et al., 2015).

A ICAM-1 desempenha um papel importante tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, mediando interações entre células endoteliais ativadas e leucócitos. Está envolvida com a migração transendotelial dos leucócitos para os locais de inflamação, bem como interações entre as células apresentadoras de antígeno e as células T, desempenhando um papel importante no processo inflamatório (LAWSON; WOLF, 2009; LIU et al., 2017).

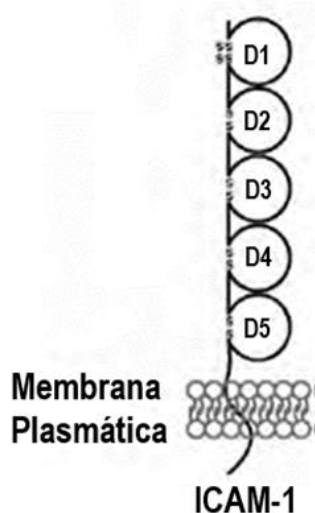


Figura 5: Estrutura da ICAM-1. Imagem ilustrando os três tipos de domínios presentes, um domínio extracelular, um transmembranar e um citoplasmático. Adaptado de (XIAO et al., 2013). D1-5: Domínios 1 a 5.

2.1.4 Complicações clínicas

Os recorrentes eventos que desencadeiam as crises vaso-oclusivas estão associados com crises de dor, que frequentemente levam a hospitalizações. Estes ciclos de eventos fisiopatológicos na AF desencadeiam várias complicações clínicas que podem ser agudas ou crônicas (ARMENIS et al., 2019). Os danos em vários órgãos mostram que a anemia falciforme é uma desordem vascular complexa (SPARKENBAUGH; PAWLINSKI, 2017). Na tabela 1, estão listadas algumas das complicações clínicas que os pacientes podem apresentar.

As complicações da AF são numerosas e podem afetar todos os órgãos e/ou tecidos no corpo. No entanto, apesar da etiologia monogênica, AF apresenta uma

alta variabilidade clínica. Em muitos, a doença pode ser grave com hospitalizações frequentes, enquanto em outros pacientes ocorre de modo assintomático (LETTRE, 2012; SILVA et al., 2015).

Tabela 1. Complicações clínicas apresentadas por pacientes com a Anemia Falciforme.

Órgão	Manifestação
Cérebro	Isquemia Cerebral
	Hemorragia Cerebral
	Isquemia cerebral silenciosa
	Declínio neurocognitivo
Sangue	Crise aplástica
	Anemia Hemolítica
	Sobrecarga de ferro
	Hipercoagulabilidade
Coração e Pulmão	Síndrome Torácica Aguda
	Hipertensão Pulmonar Arterial
	Cardiomiopatia restritiva
Olho	Retinopatia
	Hemorragias retinianas
Fígado, vesícula biliar e baço	Hepatoesplenomegalia
	Sequestro esplênico
	Atrofia esplênica
	Cálculos biliares
Urogenital	Nefropatia
	Priapismo
Pele	Úlcera Maleolar
Osso	Osteonecrose
Outros	Crises de dor
	Infecções

A maioria dos pacientes com AF apresentam um grau de hemólise que promove um quadro anêmico, além disso, situações que inibem a produção de

reticulócitos ou aceleram a destruição das hemácias pode levar a um agravamento desse quadro (AZAR; WONG, 2017).

A crise aplásica é uma anemia severa com baixa contagem de reticulócitos, que ocorre devido à supressão da eritropoese, podendo ser causada por muitos tipos de infecção, incluindo a infecção pelo parvovírus B19, o qual ataca preferencialmente os precursores eritróides, levando à destruição dos mesmos (BALLAS et al., 2012; PECKER; LITTLE, 2018).

O sequestro esplênico decorre de um congestionamento de grande volume sanguíneo no baço, resultando em anemia aguda, esplenomegalia e choque hipovolêmico (LARSSON et al., 2016). Dentre as complicações da anemia falciforme, é a que mais causa mortes em crianças e também é a primeira manifestação potencialmente fatal observada nos pacientes com AF, porém raramente esta complicação é relatada em pacientes adultos (BROUSSE; BUFFET; REES, 2014; NAYMAGON; PENDURTI; BILLETT, 2015).

As crises de dor na AF podem se apresentar como episódios agudos ou com curso crônico nos pacientes. A dor é uma causa comum de morbidade e também é associada com a severidade da doença (MCGANN; NERO; WARE, 2013; TRAN; GUPTA; GUPTA, 2017). As dores agudas, frequentemente chamadas de crises vaso-oclusivas (CVO), são uma das causas de hospitalizações nestes pacientes. As dores ocorrem difusamente ou localizadas, ocorrendo frequentemente em locais como tórax, costas, abdômen e extremidades (BRANDOW; ZAPPIA; STUCKY, 2017; PURI et al., 2017).

O priapismo é uma condição patológica de ereção peniana dolorosa por mais de 4 horas, caracterizada por ocorrer sem desejo ou estímulo sexual. Esta complicação afeta aproximadamente 80-90% dos homens com AF com pelo menos um episódio na idade de 20 anos (BALLAS; LYON, 2016). Esta condição ocorre devido a uma combinação de hipóxia e comprometimento do fluxo venoso do pênis, onde há um maior fluxo de sangue na artéria, ou um menor efluxo venoso, resultando na captura do sangue dentro dos corpos eréteis (BELLO et al., 2018; NOLAN et al., 2005).

A síndrome torácica aguda (STA) é uma complicação pulmonar séria e comum em pacientes com AF, estando associada a uma alta morbidade e mortalidade. Pacientes hospitalizados com CVO apresentam uma maior chance de desenvolver STA (PATTERSON et al., 2018). Os principais fatores que levam ao

desenvolvimento dessa complicação são as infecções, o embolismo gorduroso derivado de necrose da medula óssea e infarto pulmonar por oclusão da microvasculatura (TANTAWY et al., 2019). Pacientes com STA cursam com dor torácica, febre, hipóxia, dispneia, tosse, leucocitose, baixa no nível de hemoglobina e infiltrados no raio-X do tórax (JAIN; BAKSHI; KRISHNAMURTI, 2017).

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das causas de morte em crianças e adultos com AF, caracterizado como uma manifestação neurológica decorrente da oclusão de um vaso sanguíneo ou de uma hemorragia local, resultando em isquemia e sinais e sintomas neurológicos (BALLAS et al., 2010; CALVET et al., 2015; HIRTZ; KIRKHAM, 2019). O uso do Doppler Transcraniano (DTC) para identificar pacientes que apresentam risco elevado de desenvolver AVC e o tratamento profilático com transfusões para pacientes com alto risco mostrou que as transfusões regulares reduziu o risco de AVC nos pacientes com resultados do DTC anormal (ENNINFUL-EGHAN et al., 2010; ESTCOURT et al., 2017; STROUSE; LANZKRON; URRUTIA, 2011).

As sequelas crônicas da anemia e CVO que envolvem o sistema músculo-esquelético incluem algumas complicações como osteomielite, osteopenia, osteoporose e osteonecrose. A osteonecrose, também conhecida como necrose avascular, ocorre devido ao congestionamento venoso e interrupção do suprimento sanguíneo nos vasos que suprem o osso, causando morte celular no local (DALTRO et al., 2015; KOSARAJU et al., 2017). Os ossos longos são frequentemente afetados, onde a cabeça do fêmur e úmero são os sítios mais acometidos (JUNIOR; DAHER; ROCHA, 2012). A osteonecrose é caracterizada por osteócitos mortos e falta de vascularização na região afetada, em que essas mudanças acabam levando ao colapso do osso subcondral e a destruição da articulação nos pacientes. A severidade da osteonecrose pode variar de assintomático para debilitante, causando dores severas, redução na mobilidade e mudanças degenerativas (LI et al., 2017; TE WINKEL et al., 2014).

A úlcera de perna é a complicação cutânea mais comum e debilitante na AF, ocorrendo principalmente em adultos. A patogênese da úlcera ainda é pouco entendida e muito complexa, porém sabe-se que a diminuição na perfusão sanguínea no local (devido à vaso-oclusão) é um dos fatores que predispõem à úlcera, além de traumas, infecções, anemia severa, alta taxa hemolítica, genótipo, localização geográfica, idade e ambiente social (DELANEY et al., 2013; SENET et

al., 2017). Ocorrem mais comumente nos maléolos laterais e apresentam uma dificuldade de tratamento. Uma vez que ocorra, a úlcera tem uma velocidade de cura muito lenta e pode ser recorrente, sem nenhum regime que promova a rápida resolução da úlcera, sendo um dos maiores problemas de dificuldade terapêutica na AF (MENESES et al., 2016; PECKER; LITTLE, 2018).

A gravidade da doença pode ser influenciada pela presença de α -talassemia, haplótipos do gene da globina β e níveis de hemoglobina fetal. Alguns autores demonstraram que a ocorrência de dactilite precocemente em crianças é um fator de mau prognóstico, onde essas crianças apresentam um risco maior de apresentar complicações graves (FOUCAN et al., 2006; MCGANN; NERO; WARE, 2013; QUINN et al., 2006).

Além do AVC, as outras complicações graves da AF são difíceis de prever nos pacientes e, uma vez que os médicos esperam o aparecimento das manifestações graves para depois iniciar o tratamento, muitos estudos procuram métodos para prever estas complicações. Um melhor entendimento dessa variabilidade clínica na AF melhoraria os cuidados e orientaria o desenvolvimento de novas terapias (LETTRE, 2012; MEIER; FASANO; LEVETT, 2017; SILVA et al., 2015).

Diante disso, percebe-se a importância na pesquisa de marcadores que possam prever se os indivíduos portadores de AF apresentarão ou não um risco maior de complicações clínicas graves. Neste contexto, os microRNAs (miRNAs) podem ser considerados uma possível alternativa.

2.2 MICRORNAS

Os miRNAs são um grupo de pequenas moléculas de RNA não codificantes com aproximadamente 19 a 25 nucleotídeos de comprimento. Constituem uma classe de moléculas que tem atraído a atenção por sua capacidade de regular a expressão gênica (UEDA et al., 2009; ZHAN et al., 2007). miRNAs foram descobertos em 1993 no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, e hoje é sabido que eles estão presentes em várias espécies (DUFRESNE et al., 2018). Desde a sua descoberta, aproximadamente 9000 miRNAs foram identificados em várias espécies, em humanos há mais de 1000 sequências identificadas e estima-se que eles

regulam mais de um-terço dos RNAs mensageiros (mRNAs) nas células (KHALYFA et al., 2016; O'REILLY, 2016).

Os miRNAs participam da regulação pós-transcricional da expressão gênica em vários processos celulares, como proliferação celular, diferenciação, angiogênese, migração, adesão, apoptose e resposta imune (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015). Os miRNAs controlam a expressão gênica mediante pareamento com locais alvo, parcialmente complementares, em regiões não traduzidas 3' (3' *untranslated regions*, 3'UTR), resultando na repressão da tradução e/ou desestabilização do mRNA (INGWERSEN et al., 2015). No entanto, foram identificados sítios de ligação dos miRNAs em regiões 5'UTR e na fase de leitura aberta (*open reading frame*, ORF). Em mamíferos, os sítios de ligação são principalmente na região 3'UTR e raramente na 5'UTR e ORF, enquanto que em plantas se ligam frequentemente em regiões codificantes do mRNA (GAO et al., 2019; KIM et al., 2019; MORETTI; THERMANN; HENTZE, 2010; O'REILLY, 2016; TSUCHIYA et al., 2009; UNDI; KANDI; GUTTI, 2013).

Similarmente a genes codificadores de proteínas, os miRNAs são transcritos pela RNA Polimerase II em um microRNA primário (pri-miR). Ainda no núcleo, este pri-miR é clivado em um miRNA precursor (pre-miR) por uma RNase III (Drosha) e com a atuação de um cofator, o DGCR8, este pre-miR apresenta uma forma *hairpin* (KOHAMA et al., 2019). Vários miRNAs não convencionais, que são definidos por seu uso de estratégias de maturação alternativa foram descritos. Por exemplo, os miRNAs íntrônicos (Mirtrons), podem passar pelo processamento feito pela Drosha e usar a maquinaria de *splicing* para se tornar pre-miR (LUCAS; RAIKHEL, 2014). Os mirtrons são pequenos íntrons, que foram excisados e remodelados em estruturas que mimetizam o pre-miR e são processados em miRNAs maduros pela Dicer (CZECH; HANNON, 2011).

Esta molécula de pre-miR é, então, exportada para o citoplasma pela Exportina 5. No citoplasma, o pre-miR se associa a uma RNase III (Dicer), que o cliva em uma miRNA de fita dupla, as fitas são denominadas de fita passageira e fita guia (OLEJNICZAK; KOTOWSKA; WLODZIMIERZ, 2018). Este microRNA de fita dupla é incorporado ao Complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC), que é composto pela Dicer, TRBP e Argonauta 2 (AGO2). A AGO2 seleciona a fita que vai permanecer no complexo e a que vai ser degradada e removida (BYON; PAPAYANNOPOULOU, 2012; ROGERS; CHEN, 2013). O

miRNA maduro guia a proteína AGO2 do RISC para a sequência complementar do mRNA alvo. Em plantas, requer perfeita complementariedade com seu alvo, enquanto em mamíferos o reconhecimento do alvo ocorre através da sequência dos primeiros 8 nucleotídeos no miRNA (*seed region*). Após a ligação, o miRNA pode regular a expressão deste mRNA por meio de dois mecanismos: a degradação do RNA ou a repressão da tradução, dependendo da complementariedade do miRNA com o mRNA alvo (Figura 6) (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015; PETERSON et al., 2014).

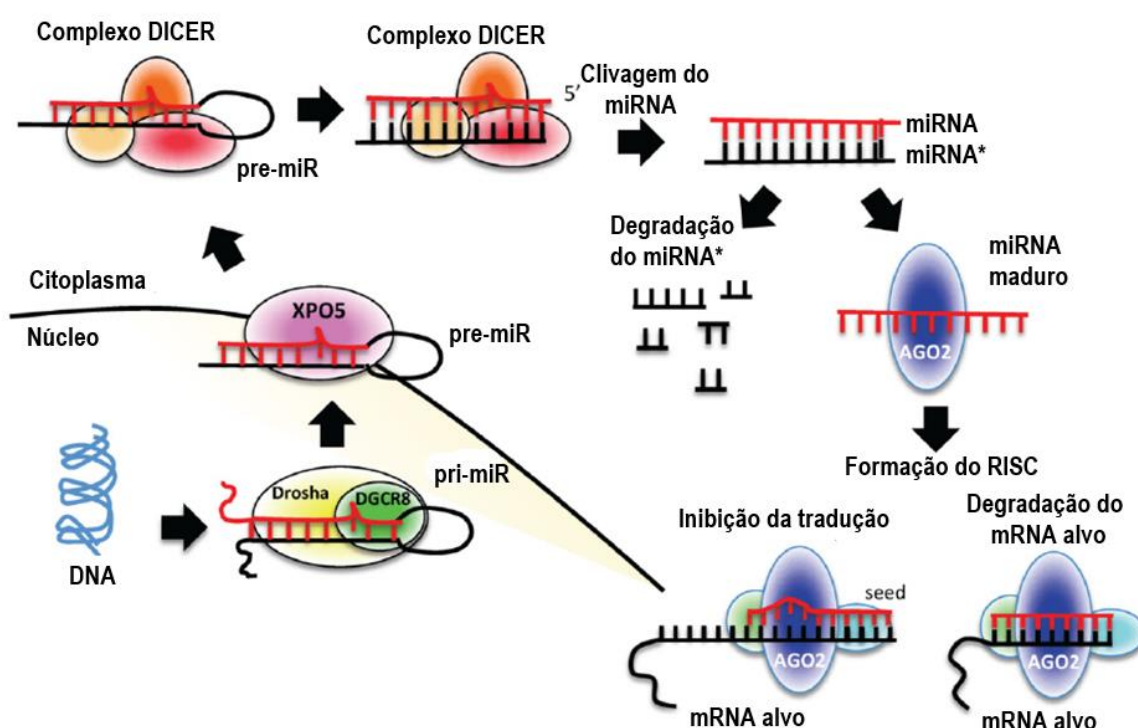


Figura 6: Biogênese dos microRNAs. Cada microRNA é transcrito pela RNA polimerase II em pri-miR do DNA genômico dentro do núcleo. Este pri-miR é processado pela Drosha-DGCR8 em pre-miR. Após o processamento, ele será transportado para o citoplasma pela exportina 5 (XPO5), onde será processado e clivado pelo complexo DICER em um miRNA de dupla-fita. Esta dupla-fita será clivada, e o miRNA maduro será adicionado ao complexo RISC. O grau de complementariedade entre o miRNA e o mRNA determinará se vai ocorrer a degradação do mRNA ou a repressão da tradução. Adaptado de (BERTOLI et al., 2015).

A degradação do mRNA ocorre quando há uma total complementariedade da ligação do miRNA ao seu alvo e, ainda que este processo não seja bem entendido, pode estar relacionado à remoção do CAP 5' e da cauda poli-A do mRNA, processo que ocorre predominante em plantas (ROGERS; CHEN, 2013; STEPIEN et al., 2016). A inibição da tradução ocorre quando há complementariedade parcial entre o miRNA e o mRNA alvo, então o mRNA será removido da maquinaria de tradução. A

presença do motivo de ligação ao CAP na proteína AGO2 humana também permite a repressão do início da tradução por impedir o recrutamento do fator eIF4E. A AGO também pode interagir com uma proteína regulatória (scaffold), a qual pode formar interações com efetores como o CCR4-NOT que recruta repressores da tradução e DDX6, um ativador de decapeamento (CUI; JOO, 2019; SEOK et al., 2017; UNDI; KANDI; GUTTI, 2013).

Estudos demonstraram 3 vias diferentes para secreção e transporte dos miRNAs circulantes: 1) corpos microvesiculares que incluem os exossomos, microvesículas (MV), os quais podem facilmente passar através da membrana celular facilitando a entrada do miRNA na célula alvo e mediar a comunicação celular, ou corpos apoptóticos, que diferem dos exossomos pela ausência de marcadores específicos na superfície; 2) proteínas de ligação ao miRNA, que inclui a Argonauta 2 (AGO2); e 3) lipoproteína de alta densidade (HDL) (JUNG; SUH, 2015; XU; YANG; AI, 2013; ZHANG et al., 2015).

Muitos estudos foram conduzidos para avaliar o papel dos miRNAs como biomarcadores não-invasivos para a detecção precoce de várias doenças, apresentando uso na clínica (CAMMARATA et al., 2010; FEHLMANN et al., 2017; FRIDRICH; HAZAN; MORAN, 2019; GONÇALVES et al., 2019; LEIDINGER et al., 2013; ROTH et al., 2015). Com relação a medicina translacional os miRNAs estão se mostrando como possíveis alvos terapêuticos (FINOTTI et al., 2019; GHELANI; RACHCHH; GOKANI, 2012). Diminuindo sua atividade utilizando oligômeros inibidores de miRNA ou moléculas que interferem no sítio de ligação do miRNA (LU et al., 2009; MURAKAMI; MIYAGISHI, 2014). Em contraste, o uso de miRNAs miméticos ou sintéticos pode levar a uma potencialização da função do miRNA (ASKOU et al., 2015; MONTGOMERY et al., 2014).

Os microRNAs são estáveis em fluídos, como o sangue, resistindo a condições como calor, mudanças no pH e armazenamento estendido. A sua alta estabilidade se deve à ligação à AGO e também por se ligar a microvesículas, que protegem o miRNA de ser degradado pelas RNases presentes na circulação (BALZANO et al., 2017; TOYAMA et al., 2017). A análise dos perfis de miRNAs circulantes fornecem dados para previsão de risco, gravidade da doença e diagnóstico. Expressão alterada desses miRNAs circulantes tem sido associada com algumas doenças como câncer, doenças autoimunes e inflamatórias (D'SOUZA et al., 2019).

Evidências mostram que miRNAs podem estar relacionados com a hematopoese, estando envolvidos na maturação e diferenciação. Cada linhagem apresenta um padrão de miRNA envolvido na regulação da expressão gênica, porém este padrão pode ser alterado em algumas doenças (CHOONG; YANG; MCNIECE, 2007). Chen e colaboradores (2008) mostraram que o padrão de miRNAs expresso em hemácias de pacientes com AF é diferente do padrão apresentado em indivíduos sem a doença (CHEN et al., 2008). Este padrão diferenciado pode estar relacionado com a severidade da doença e com condições de estresse oxidativo, tornando os miRNAs como bons alvos para estudos (SAKI et al., 2016).

Alguns miRNAs são importantes reguladores da função e biologia endotelial sendo capazes de regular mRNAs que codificam proteínas que tem função em processos de adesão celular. A superfamília das imunoglobulinas de moléculas de adesão celular representa uma importante classe de receptores de adesão célula-célula (SCHLESINGER; BENDAS, 2015). Desta, destaca-se alguns receptores como ICAM-1 e VCAM-1. A ICAM-1 é alvo de alguns miRNAs, como o miR-221. Similarmente, miR-126 pode controlar a expressão da VCAM-1. microRNAs podem regular a expressão de moléculas de adesão e consequentemente inibir a aderência de leucócitos às células endoteliais, evidencias que comprovam que miRNAs podem controlar a inflamação vascular, mostrando seu potencial papel na anemia falciforme (CERUTTI et al., 2017; ZHONG; SIMARD; HUOT, 2018).

2.2.1 miRNA-221

O miR-221 está presente em um *cluster* gênico miR-221/222 que está localizado em uma região intergênica no cromossomo X (Xp11.3) e são separados por uma distância de 726 pares de bases (LEWIS; JORDAN; TOLLEFSBOL, 2019). Eles são transcritos em um comum pri-miR-221/222 que então será processado em pre-miR individuais que apresentam aproximadamente 100 nucleotídeos. A maturação do pre-miR-221 resulta na formação do miR-221-5p ou miR-221-3p, com tamanho de 23 nucleotídeos (CHISTIakov et al., 2015; GALARDI et al., 2007).

miR-221 é um microRNA multifuncional que está envolvido na regulação de muitos eventos fisiológicos e patológicos, como o processo de transição epitelial-

mesenquimal (LIANG et al., 2018), apoptose, resposta inflamatória (YE et al., 2018) e regula a resposta cardíaca à miocardite (ZHANG et al., 2019a).

Muitos estudos também tem reportado a relação entre o miR-221 e o câncer, o qual age como um oncogene em uma grande variedade de malignidades sólidas e hematológicas, incluindo glioblastoma, câncer de mama, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, leucemia linfóide crônica e leucemia mieloide aguda e crônica (CALLEGARI et al., 2019; DI MARTINO et al., 2016; PEÑA-CANO et al., 2019; SHAO et al., 2018). Ao inibir proteínas supressoras de tumor, tais como p27^{Kip1} (p27), PUMA, p53, TIMP3 e Bim, o miR-221 promove resistência à alguns fármacos quimioterápicos (GAROFALO et al., 2012; SONG et al., 2017; XU et al., 2019).

É um miRNA altamente conservado em vertebrados, um dos mais abundantes em células epiteliais e tem sido relacionado com a regulação de processos vasculares (SONG et al., 2017). Ganhou muita atenção em doenças inflamatórias, pois algumas moléculas pró-inflamatórias podem induzir a expressão do miR-221, como o fator de transcrição inflamatório NF-κB. O miR-221 também pode regular a migração e inflamação endotelial através da regulação da angiotensina II (CHEN et al., 2015; PENG et al., 2017).

A abundância do miR-221 pode assegurar a baixa expressão de ICAM-1 em condições fisiológicas. Estudos *in vitro* mostraram que ele inibe a tradução de ICAM-1 e regula a sua expressão nos tecidos (DUAN et al., 2013; GONG et al., 2011; LIU et al., 2017). Hu et al. (2010) demonstrou que o miR-221 suprime a tradução e regula a expressão de ICAM-1 nas células epiteliais das vias biliares humanas, porém não houve degradação do mRNA. A inibição funcional do miR-221 com anti-miR-221 induziu a expressão da proteína (HU et al., 2010). Um estudo realizado por Sung et al. (2018) mostrou que ao utilizar um extrato de plantas em células epiteliais do pulmão houve um aumento da expressão do miR-221 e consequentemente a expressão de ICAM-1 foi diminuída (SUNG et al., 2018).

2.2.2 miRNA-126

O miR-126 é pertencente a uma família de miRNAs altamente conservada, está localizado no 7° íntron do gene do fator de crescimento epidérmico "como domínio 7" no cromossomo 9 (9q34.3) (YANG et al., 2017; ZHANG et al., 2008). É

comumente expresso em células epiteliais, no coração, pulmão e outros tecidos (YANG et al., 2017).

Os primeiros estudos com este miRNA envolviam regulação de moléculas de adesão endotelial em processos inflamatórios, porém ele tem sido relacionado também com o controle da integridade vascular e angiogênese, estando envolvido na modulação da liberação de alguns fatores angiogênicos (CERUTTI et al., 2017; FANG et al., 2017). É um dos mais importantes miRNAs que manipulam a integridade vascular e angiogênese podendo promover o reparo celular no endotélio vascular através da inibição de genes alvo SPRED1 e PIK3R2 para facilitar a produção do fator de crescimento endotelial vascular e do fator de crescimento de fibroblasto (CUI et al., 2018; WANG et al., 2016).

Em muitos casos, apresenta também função como supressor de tumor. Estudos vêm sendo concentrados na associação do mir-126 e o prognóstico do câncer. A sua baixa expressão está diminuída em alguns tipos de câncer, entre estes o câncer de mama, de intestino e de pulmão (DONG et al., 2016; FENG et al., 2010; SUN et al., 2010; TAVAZOIE et al., 2009). Pode ser usado como um anti-oncogene por inibir a migração e invasão de células cancerígenas (MENG et al., 2019).

O miR-126 regula negativamente a expressão de VCAM-1 em células endoteliais, impedindo o processo de adesão e migração celular, o que faz com que apresente um potencial anti-inflamatório (BAI et al., 2017; HARRIS et al., 2008; SUÁREZ et al., 2010; WITKOWSKI et al., 2016). Gao et al. (2019) mostrou em seu trabalho que a regulação positiva do miR-126 inibe a expressão de VCAM-1 e do TNF- α , limitando a aderência dos leucócitos às células endoteliais, reduzindo a resposta inflamatória envolvida no processo de aterosclerose (GAO et al., 2019).

ICAM-1 e VCAM-1 apresentam um papel importante na fisiopatologia da AF, o miR-221 sendo um dos mais importantes miRNA estudados na regulação da inflamação um dos motivos sendo a regulação da expressão de ICAM-1 e o miR-126, importante regulador do endotélio vascular podendo regular a expressão de VCAM-1, se tornam alvos interessantes para estudo na AF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O grupo amostral foi constituído por 81 indivíduos, dentre eles portadores de anemia falciforme (HbSS) não relacionados, cadastrados e acompanhados no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE (Recife – PE) e indivíduos com HbAA. De acordo com a presença ou ausência de complicações clínicas, esses pacientes foram classificados em três grupos:

1. Grupo caso: Composto por 53 pacientes com idade maior que 18 anos e que apresentaram relatos das complicações clínicas da AF – STA, AVC, úlcera, osteonecrose e/ou priapismo – relatados no prontuário;
2. Grupo controle: Composto por 18 pacientes com idade maior que 18 anos e que não apresentaram ao longo de seu segmento na Fundação HEMOPE nenhuma complicação clínica confirmada em prontuário.
3. Grupo HbAA: Composto por 10 indivíduos (5 mulheres e 5 homens), acima de 18 anos de ambos os sexos, com perfil de hemoglobina normal do adulto (HbAA) que não apresentaram infecções e inflamações prévias.

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, sem transfusões sanguíneas nos últimos 3 meses antes da coleta e que não estavam utilizando Hidroxiuréia. Os pacientes que não obedeceram a esses critérios não tiveram suas amostras coletadas.

A cada convocação feita por telefone ou durante as visitas de rotina, cerca de 8 ml de sangue periférico foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante e enviado ao setor de Hematologia e Biologia Molecular do Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para a realização das análises moleculares.

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Estudo do tipo coorte transversal com comparação interna de grupos, realizado no período de março/2017 a junho/2019. O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco, tendo a Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) como instituição coparticipante, onde foram coletadas as amostras e realizadas as análises dos prontuários dos pacientes participantes.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/CCS/UFPE - Nº do parecer: 2.472.666) (Anexo I). Após a aprovação, foi desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). A Fundação HEMOPE foi incluída como instituição coparticipante, pois os pacientes foram oriundos da mesma.

Os pacientes, após explicação do projeto, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelo CEP (Anexo II).

3.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E CLÍNICA

Os dados hematológicos foram obtidos utilizando contador eletrônico de células (STKS, Coulter Corporation, FL, USA). A quantificação das hemoglobinas fetal (HbF), HbA, HbA₂ e HbS foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – VARIANT / BIO-RAD, CA, USA). Os dados clínicos foram obtidos pela análise de prontuários de acompanhamento médico dos pacientes que comparecem regularmente ao ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE.

3.5 ANÁLISE MOLECULAR

3.5.1 Extração dos microRNAs

Os miRNAs foram extraídos das amostras de sangue periférico dos pacientes com a utilização do *mirVana™ PARIS™ Kit* (Life Technologies) segundo protocolo do fabricante. O primeiro passo foi uma extração orgânica que utiliza uma solução desnaturante e ácido fenol-clorofórmio. Este passo isola o RNA total da amostra. O próximo passo foi o enriquecimento da amostra com miRNAs através da imobilização do RNA em filtros e de duas filtrações seguidas com concentrações diferentes de etanol 100%. A seguir, algumas etapas de lavagens foram necessárias para remoção de impurezas, após as lavagens o miRNA foi ressuspenso em uma solução de eluição de baixa força iônica e armazenado à -80°C para posterior uso.

As amostras de miRNA obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, Rockland, DE) e a análise da integridade foi avaliada no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) no Laboratório de Hematologia da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto.

3.5.2 Análise da expressão dos microRNAs

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Doenças Transmissíveis no instituto de pesquisa Aggeu Magalhães- FIOCRUZ. Para a avaliação da expressão dos miRNAs foi feita uma reação de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR) em triplicata utilizando o equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher). A síntese do DNA complementar (cDNA) ocorreu a partir de uma solução contendo 10 ng de miRNA em 15 µl, utilizando o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de RT-qPCR foi realizada utilizando o *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para as sondas específicas do miR-221 (Número de catálogo: 002096) e miR-126 (Número de catálogo: 002228), seguindo as instruções do fabricante. Cada sonda específica foi marcada com o fluoróforo FAM e seu quencher não-fluorescente. O RNU6B (Número de catálogo: 001223) foi

utilizado como gene de referência nas reações. A reação consistiu de 10µl do 2X Master Mix Universal TaqMan, 1,33µl de cDNA e 1,0µl de 20X das sondas.

As diferenças entre os valores dos Ct's do miRNA testado e RNU6B foram calculados para determinar os níveis de expressão relativa dos miRNAs. A diferença no número de Ct ($\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{RNU6B}$) foi calculado para cada triplicata. 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)). 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 dos miRNAs foram calculados segundo o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{pacientes\ AF} - \Delta Ct_{referência\ (Hb\ AA)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.6 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 e Mann-Whitney foi utilizada para comparações entre as variáveis contínuas. Todos os valores de P foram ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando o software SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) e o GraphPAD Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Após analisar 703 prontuários de pacientes portadores de anemia falciforme do HEMOPE, 81 indivíduos foram selecionados para a pesquisa. Destes pacientes, 18 (22,2%) se enquadraram no grupo controle HbSS, 10 (12,3%) foram indivíduos HbAA e 53 (65,5%) foram do grupo caso, cuja mediana de idade foi de 27 anos (18 – 60). Do grupo caso, 52,8% apresentou mais que 3 CVO ao ano, enquanto 44,5% dos controles apresentaram esta quantidade de CVO. As manifestações clínicas mais frequentes foram a úlcera maleolar e o priapismo, representando 64,2% e 30,2% na população estudada, respectivamente. Os resultados da caracterização laboratorial, clínica e demográfica estão descritos na tabela 2 e 3.

Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo.

Características laboratoriais	Mediana	Intervalo
Hemácias ($\times 10^6$ células/ μ L)	2,6	1,9 – 4,0
Hemoglobina (g/dL)	8,0	5,2 – 11,1
Hematócrito (%)	23,9	16,3 – 35,1
VCM (fL)	92,3	71,9 – 118,0
HCM (g/dL)	31,2	21,2 – 39,8
Leucócitos ($\times 10^6$ /L)	12,1	6,4 – 19,5
Plaquetas ($\times 10^9$ /L)	417	72 – 696
Reticulócitos (%)	9,5	1,8 – 26,2
HbF (%)	6,7	1,5 – 23,0
Bilirrubina Total (md/dL)	3,1	1,9 – 13,6
Bilirrubina indireta (md/dL)	2,3	1,5 – 12,8
LDH (U/L)	806	232 – 3542

VCM, Volume corpuscular médio; HCM, Hemoglobina corpuscular média; HbF, Hemoglobina fetal; LDH, Lactato desidrogenase.

Tabela 3: Caracterização clínica e demográfica dos pacientes incluídos no estudo.

Caracterização dos pacientes	n (%) (n = 81)
Sexo	
Masculino	43 (53,1)
Feminino	38 (46,9)
Idade	
Mediana (anos)	27
Intervalo (anos)	18 – 60
CVO	
<3x/ano	35 (49,3)
>3x/ano	27 (38,0)
>6x/ano	9 (12,7)
Número de manifestações clínicas	
0	18 (25,3)
1	31 (43,7)
2 ou mais	22 (31,0)
Úlcera Maleolar	34 (64,2)
Priapismo	16 (30,2)
STA	11 (20,8)
Osteonecrose	14 (26,4)
AVC	7 (13,2)
CVO, Crises vaso-oclusivas; STA, Síndrome torácica aguda; AVC, Acidente vascular cerebral.	

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-126

Inicialmente, foi comparado os valores da expressão relativa do miRNA-126 entre os pacientes controles e casos. A análise mostrou que houve um aumento no perfil de expressão dos pacientes do grupo caso em relação aos outros grupos ($p=0,0041$; Figura 7A). Em seguida, avaliamos os valores da expressão do miR-126

com a presença ou ausência das manifestações clínicas apresentadas, onde foi observado que pacientes que desenvolveram úlcera maleolar tiveram um nível de expressão aproximadamente 5 vezes maior que aqueles que não apresentaram essa manifestação ($p=0,0008$, Fold Change=5,1; Figura 7B). Contudo, avaliando as outras manifestações clínicas, não houve diferença nos níveis do miR-126. Do mesmo modo, ao comparar a expressão com a quantidade de CVO nos pacientes, não houve diferença significativa ($p=0,261$).

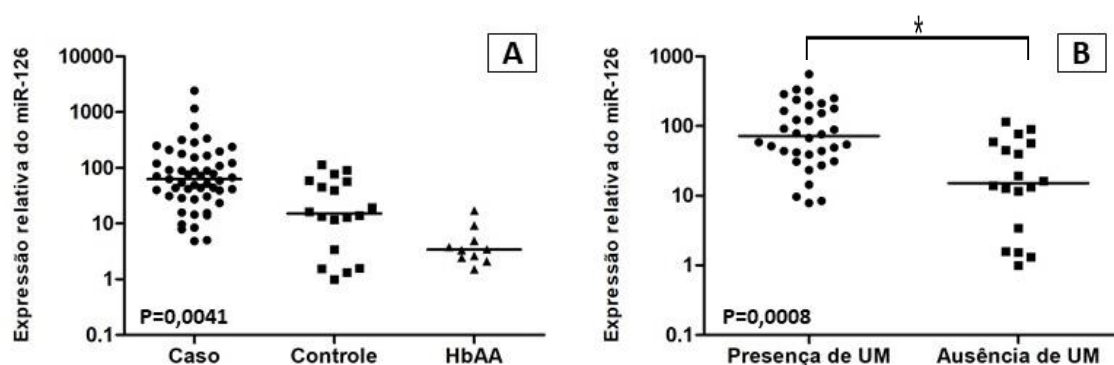


Figura 7: Expressão relativa do miR-126. A) Análise da expressão do miR-126 entre os grupos estudados. B) Diferença entre a expressão do miR-221 entre pacientes com UM presente e ausente. As barras horizontais representam a mediana.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MIRNA-221

O perfil de expressão do miR-221 entre os pacientes do grupo caso frente os outros dois grupos apresentou um aumento significativo ($p=0,0003$; Figura 8A), ao comparar a expressão com a quantidade de CVO nos pacientes, não houve diferença significativa ($p=0,224$). Porém, ao analisar o perfil de expressão do miRNA-221 em pacientes que desenvolveram UM frente a ausência da mesma, observamos que pacientes que apresentaram a manifestação tiveram um nível aproximadamente 6 vezes maior da expressão do microRNA ($p=0,0001$, FC=5,9; Figura 8B).

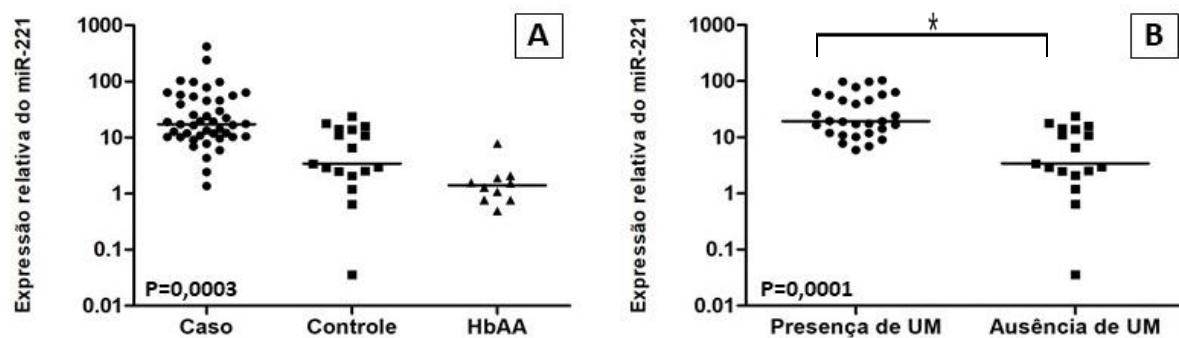


Figura 8: Expressão relativa do miR-221. A) Análise da expressão do miR-221 entre os grupos estudados. B) Diferença entre a expressão do miR-221 entre pacientes com UM presente e ausente. As barras horizontais representam a mediana.

5 DISCUSSÃO

A anemia falciforme apresenta um quadro clínico muito heterogêneo, essa característica da doença é a motivação para pesquisas de marcadores e moduladores moleculares de aplicação clínica para identificação de indivíduos com maior predisposição ao desenvolvimento de manifestações clínicas dessa desordem genética (HILLIARD et al., 2018; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012; VATHIPADIEKAL et al., 2017). Esta heterogeneidade fenotípica nos pacientes com AF ainda permanece sem esclarecimentos, assim, a busca por novos marcadores moleculares e por um melhor entendimento dos processos fisiopatológicos dessa doença continua sendo de extrema importância.

A vaso-oclusão é um processo complexo e multifatorial, nesse processo as moléculas de adesão desempenham uma importante função. As componentes da superfamília das imunoglobulinas ICAM-1 e VCAM-1 são duas moléculas essenciais para que a vaso-oclusão ocorra (HUNEINI et al., 2017). Os pacientes normalmente apresentam episódios de crises de dor, as quais são chamadas de crises vaso-oclusivas (CVO) e esses episódios podem ocorrer em um grande número no decorrer do ano. Resultados do nosso estudo mostram que os pacientes do grupo caso apresentaram um maior número de CVO ao ano, este resultado corrobora com dados da literatura que comprovam que quanto mais eventos vaso-oclusivos maior severidade clínica nesses indivíduos (GOODMAN et al., 2016; QUINN; MILLER, 2004).

Muitos estudos estão voltados para a regulação transcricional na AF, porém estudos recentes estão focados em mecanismos de regulação pós-transcricional, principalmente via microRNAs (HABARA; STEINBERG, 2016; SUN et al., 2012). Estudos com o papel dos miRNAs na ocorrência de doenças determina a importância deles em regular processos fisiológicos e patológicos do organismo (CHEN et al., 2015; KATO; CASTRO; NATARAJAN, 2014; ZHANG et al., 2018).

No presente estudo foi avaliado a expressão do miR-126 e do miR-221 em pacientes com AF para avaliar a relação deles com a clínica dos mesmos. O miR-126 que se encontra no íntron do gene *EGFL7*, está envolvido com a integridade vascular, homeostase endotelial e angiogênese (FANG et al., 2017), apresenta também importante papel como supressor de tumor, inibindo a proliferação do câncer e metástase por se ligar a alguns alvos (KAFAJI et al., 2018).

Em nosso estudo os resultados encontrados mostraram que houve um aumento nos níveis de expressão desse miRNA nos pacientes do grupo caso e também um aumento desse miRNA em pacientes que desenvolveram UM. Durante a inflamação vascular o miR-126 apresenta atividade na supressão do processo inflamatório (YAMAKUCHI, 2012). No estudo desenvolvido por Harris et al. (2008) ele mostrou que VCAM-1 é um alvo direto do miR-126, além disso, os resultados também indicaram que um silenciamento desse microRNA promove uma maior aderência de leucócitos ao endotélio por aumentar a expressão de VCAM-1 estimulada por TNF- α (HARRIS et al., 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Wang et al. (2016), o qual mostrou uma maior expressão da molécula de adesão e um menor nível de expressão do miR-126 (WANG et al., 2016). Estes dados podem significar que está havendo uma tentativa de feedback negativo por haver um possível aumento da VCAM-1 nesses pacientes, havendo uma necessidade de uma maior expressão desse miRNA para que ocorra uma diminuição da expressão de VCAM-1.

No trabalho desenvolvido por Sui et al. (2014) ele verificou que o miR-126 está envolvido na prevenção do estresse oxidativo endotelial e na proteção das células de injúria oxidativa (SUI et al., 2014). Na AF ocorre o aumento do estresse oxidativo e também de moléculas de adesão, sendo importante a regulação dessas vias, consequentemente um aumento da expressão do miR-126. Nosso trabalho é o primeiro estudo desse miRNA com a AF, então estudos funcionais são necessários para verificar se o produto do gene *VCAM1* está realmente mais expresso e avaliar outras vias em que o miR-126 possa estar atuando nesta patologia.

O miR-221 é uma molécula multifuncional que está envolvida principalmente na inflamação e processos vasculares (ZHAO et al., 2018). É localizado num *cluster* gênico no cromossomo X, com o miR-222 e apresenta sequências semelhantes e são bem conservados em vertebrados (ELATTA et al., 2018). A regulação do miR-221 promove progressão do ciclo celular, angiogênese e se mostrou como um RNA anti-apoptótico (ABDEL-AL et al., 2018).

Em nosso trabalho encontramos um aumento no perfil de expressão do miR-221 entre os grupos estudados, diferente dos resultados apresentados por Hu et al. (2010) que mostraram que o microRNA-221 tem como alvo a região 3'UTR de ICAM-1 suprimindo então a sua tradução nos colangiócitos, estando envolvido na regulação das respostas inflamatórias (HU et al., 2010). Duan et al. (2013) mostrou

que a maior expressão do miR-221 levou a uma menor expressão da ICAM-1 e também diminuiu a adesão dos monócitos nessas células (DUAN et al., 2013). Na AF há uma maior expressão de moléculas de adesão o que significa que o miR-221 deveria estar com níveis mais baixos, porém com os resultados do nosso estudo identificamos que o miR-221 pode não estar regulando diretamente a molécula de adesão nessa doença.

Ao separarmos por manifestações clínicas, a expressão do miRNA-221 foi também maior nos pacientes que apresentaram UM. Este fato, corrobora com a proposta que com uma maior expressão do mesmo ele leva a um quadro inflamatório maior, demonstrando que há um papel do miR-221 na regulação de vias pró-inflamatórias. Como foi observado por Zhao et al. (2016), o aumento da expressão do miR-221 em macrófagos leva a uma significativa ativação do NF- κ B que foi associado com a produção de citocinas inflamatórias (ZHAO et al., 2016). Chen et al. (2015) também encontrou resultados semelhantes, onde o miR-221 e o NF- κ B podem formar um feedback positivo para aumentar a resposta inflamatória (CHEN et al., 2015). Zhang et al. (2019) também encontrou que o miR-221 pode atuar inibindo a produção de óxido nítrico que é um importante vasodilatador (ZHANG et al., 2019b), isto leva a um ambiente favorável para a vaso-oclusão e consequentemente o desenvolvimento de manifestações clínicas como a UM, indicando uma possível relação desse microRNA com a presença da UM.

Vale ressaltar que estudos com a pesquisa de microRNAs em pacientes com anemia falciforme ainda são escassos e que nossa pesquisa é a primeira a avaliar a relação entre os perfis de expressão desses dois miRNAs e as manifestações clínicas na AF. Em nosso estudo ao avaliar os perfis de expressão desses miRNAs em pacientes falciformes e em indivíduos HbAA observamos que há uma maior expressão deles em pacientes HbSS, estes resultados são semelhantes ao visto por LaMonte et al. (2013) em que eritrócitos HbSS apresentavam maior expressão do miR-451 quando em comparação ao eritrócito HbAA (LAMONTE et al., 2013), indicando uma possível relação desses miRNAs com a inflamação na AF.

Estes miRNAs podem se tornar uma ferramenta que pode ajudar na avaliação do prognóstico do paciente e ajudar no plano de tratamento para o paciente. Porém ainda se precisa de mais estudos para verificar a relação da expressão dos miRNA em pacientes falciformes, como estudos funcionais para verificar o papel deles

nessa doença e na regulação das moléculas de adesão e avaliar se esses microRNAs podem ser possíveis biomarcadores da severidade da doença.

6 CONCLUSÕES

1. Os níveis de expressão do miRNA-126 foram maiores em pacientes do grupo caso, porém não foram relacionados com a presença da maioria das complicações clínicas da AF;
2. Houve uma maior expressão do miRNA-221 nos pacientes do grupo caso, no entanto, não foram relacionados com a presença da maioria das complicações clínicas da AF;
3. Pacientes com UM possuem maiores níveis de expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 em relação aos pacientes que não apresentam a mesma.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AL, A. et al. miRNA-221 and miRNA-222 are Promising Biomarkers for Progression of Liver Fibrosis in HCV Egyptian Patients. **Virus Research**, v. 253, p. 135–139, 2018.
- AKINGBOLA, T. S. et al. Comparison of Patients from Nigeria and the USA Highlights Modifiable Risk Factors for Sickle Cell Anemia Complications. **National Institutes of Health**, v. 38, n. 4, p. 236–243, 2015.
- ALAGBE, A. E. et al. Interleukin-27 and interleukin-37 are elevated in sickle cell anemia patients and inhibit in vitro secretion of interleukin-8 in neutrophils and monocytes. **Cytokine**, v. 107, n. December, p. 85–92, 2018.
- ANSARI, J. et al. Sickle cell disease: a malady beyond a hemoglobin defect in cerebrovascular disease. **Expert review of hematology**, v. 4086, n. December 2017, p. 1–11, 2017.
- ANTWI-BOASIAGO, C. et al. Levels of Soluble Endothelium Adhesion Molecules and Complications among Sickle Cell Disease Patients in Ghana. **Diseases**, v. 6, p. 1–7, 2018.
- ARMENIS, I. et al. Reduced peripheral blood superoxide dismutase 2 expression in sickle cell disease. **Annals of Hematology**, v. 98, n. 7, p. 1561–1572, 2019.
- ASKOU, A. L. et al. Multigenic lentiviral vectors for combined and tissue-specific expression of miRNA- and protein-based antiangiogenic factors. **Mol Ther Methods Clin Dev**, v. 28, n. 2, p. 1–11, 2015.
- AZAR, S.; WONG, T. E. Sickle Cell Disease: A Brief Update. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 2, p. 375–393, 2017.
- BAI, X. et al. MicroRNA-126 Reduces Blood-Retina Barrier Breakdown via the Regulation of VCAM-1 and BCL2L1 in Ischemic Retinopathy. **Ophthalmic Research**, v. 57, n. 3, p. 173–185, 2017.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.
- BALLAS, S. K. et al. Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–55, jan. 2012.
- BALLAS, S. K.; LYON, D. Safety and efficacy of blood exchange transfusion for priapism complicating sickle cell disease. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 31, n. 1, p. 5–10, fev. 2016.
- BALZANO, F. et al. MicroRNA expression analysis of centenarians and rheumatoid arthritis patients reveals a common expression pattern. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 7, p. 622–628, 2017.
- BELLO, A. et al. Surgical treatment of priapism in sickle cell patients : A noble therapy in preserving erection. n. 1, p. 2016–2019, 2018.
- BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. Micronas: New biomarkers for diagnosis,

- prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122–1143, 2015.
- BRANDOW, A. M.; ZAPPIA, K. J.; STUCKY, C. L. Sick cell disease: a natural model of acute and chronic pain. **PAIN**, v. 158, n. 4, p. S79–S84, abr. 2017.
- BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. The spleen and sickle cell disease: The sick(led) spleen. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 2, p. 165–176, 2014.
- BYON, J. C. H.; PAPAYANNOPOULOU, T. MicroRNAs: Allies or Foes in erythropoiesis? **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 1, p. 7–13, 2012.
- CALLEGARI, E. et al. MicroRNA-Based Prophylaxis in a Mouse Model of Cirrhosis and Liver Cancer. **Molecular Therapy: Nucleic Acid**, v. 14, p. 239–250, 2019.
- CALVET, D. et al. First Ischemic Stroke in Sickle-Cell Disease: Are There Any Adult Specificities? **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 46, n. 8, p. 2315–2317, 2015.
- CAMMARATA, G. et al. Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 5, p. 331–339, 2010.
- CERUTTI, C. et al. MiR-126 and miR-126* regulate shear-resistant firm leukocyte adhesion to human brain endothelium. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–14, 2017.
- CHEN, C. et al. MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and in inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1. **Gene**, v. 565, n. 2, p. 246–251, 2015.
- CHEN, S. Y. et al. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, 2008.
- CHISTIakov, D. A. et al. Human miR-221/222 in physiological and atherosclerotic vascular remodeling. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- CHOONG, M. L.; YANG, H. H.; MCNIECE, I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 4, p. 551–564, 2007.
- CHOU, C.-H. et al. Impact of Intercellular Adhesion Molecule-1 Genetic Polymorphisms on Coronary Artery Disease Susceptibility in Taiwanese Subjects. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 510–516, 2015.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009.
- COOK-MILLS, J. M.; MARCHESE, M. E.; ABDALA-VALENCIA, H. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1607–1638, 2011.
- CUI, C. et al. Target regulation of both VECs and VSMCs by dual-loading miRNA-126 and miRNA-145 in the bilayered electrospun membrane for small-diameter vascular regeneration. **J Biomed Mater Res A**, v. 107, n. 2, p. 371–382, 2018.

CUI, T. J.; JOO, C. Facilitated diffusion of Argonaute-mediated target search. **RNA Biology**, v. 8, p. 1–15, 2019.

CZECH, B.; HANNON, G. J. Small RNA sorting: Matchmaking for argonautes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 1, p. 19–31, 2011.

D'SOUZA, R. F. et al. Circulatory microRNAs are not effective biomarkers of muscle size and function in middle-aged men. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 316, n. 2, p. 293–298, 2019.

DALTRO, G. C. et al. Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 110, 2015.

DELANEY, K.-M. H. et al. Leg ulcers in sickle cell disease: current patterns and practices. **Hemoglobin**, v. 37, n. 4, p. 325–32, 2013.

DI MARTINO, M. T. et al. Mir-221 / 222 are promising targets for innovative anticancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 9, p. 1099–1108, 2016.

DONG, Y. et al. Prognostic significance of miR-126 in various cancers : a meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2547–2555, 2016.

DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. Anemia falciforme: Desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 783–790, 2012.

DUAN, M. et al. HIV Tat Induces Expression of ICAM-1 in HUVECs: Implications for miR-221/-222 in HIV-Associated Cardiomyopathy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–11, 2013.

DUBERT, M. et al. Degree of anemia, indirect markers of hemolysis, and vascular complications of sickle cell disease in Africa. **Blood**, v. 130, n. 20, p. 2215–2223, 2017.

DUFRESNE, S. et al. A Review of Physical Activity and Circulating miRNA Expression: Implications in Cancer Risk and Progression. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 27, n. 1, p. 11–24, jan. 2018.

ELATTA, A. S. A. et al. Upregulation of miR - 221 / 222 expression in rheumatoid arthritis (RA) patients : correlation with disease activity. **Clinical and Experimental Medicine**, p. 1–7, 2018.

ENNINFUL-EGHAN, H. et al. Transcranial Doppler ultrasonography and prophylactic transfusion program is effective in preventing overt stroke in children with sickle cell disease. **J Pediatr**, v. 157, n. 3, p. 479–484, 2010.

ESTCOURT, L. J. et al. Interventions for preventing silent cerebral infarcts in people with sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2017, n. 5, 2017.

FAES, C. et al. Red blood cells modulate structure and dynamics of venous clot formation in sickle cell disease sickle cell disease. **Blood**, v. 133, n. 23, p. 2529–2541, 2019.

FANG, S. et al. MicroRNA-126 inhibits cell viability and invasion in a diabetic retinopathy model via targeting IRS-1. **Oncology Letters**, v. 14, n. 4, p. 4311–4318,

2017.

FEHLMANN, T. et al. A review of databases predicting the effects of SNPs in miRNA genes or miRNA-binding sites. **Briefings in Bioinformatics**, n. October 2017, p. 1–10, 2017.

FENG, R. et al. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 298, n. 1, p. 50–63, 2010.

FERRAZ, M. H. C.; MURAO, M. Laboratorial diagnosis of sickle cell disease in the neonate and after the sixth month of life. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 218–222, 2007.

FERRONE, F. A. Targeting HbS Polymerization. **Seminars in Hematology**, v. 55, n. 2, p. 53–59, 2018.

FINOTTI, A. et al. MicroRNAs and Long Non - coding RNAs in Genetic Diseases. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 23, n. 2, p. 155–171, 2019.

FOUCAN, L. et al. Early onset dactylitis associated with the occurrence of severe events in children with sickle cell anaemia. The Paediatric Cohort of Guadeloupe (1984-99). **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 20, n. 1, p. 59–66, 2006.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease : old discoveries , new concepts , and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850– 58 doi:10.1172/JCI30920, 2007.

FRIDRICH, A.; HAZAN, Y.; MORAN, Y. Too Many False Targets for MicroRNAs : Challenges and Pitfalls in Prediction of miRNA Targets and Their Gene Ontology in Model and Non - model Organisms. **BioEssays**, v. 41, n. 4, p. 1–11, 2019.

GALARDI, S. et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 32, p. 23716–23724, 2007.

GAO, J. et al. Plasma miR-126 and miR-143 as Potential Novel Biomarkers for Cerebral Atherosclerosis. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 28, n. 1, p. 38–43, 2019.

GAROFALO, M. et al. miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 1, p. 27–33, 2012.

GHELANI, H. S.; RACHCHH, M. A.; GOKANI, R. H. MicroRNAs as newer therapeutic targets : A big hope from a tiny player. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 3, n. 3, p. 217–227, 2012.

GOH, Q. et al. Intercellular adhesion molecule-1 expression by skeletal muscle cells augments myogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 331, n. 2, p. 292–308, fev. 2015.

GONÇALVES, T. F. et al. Network Profiling of Brain-Expressed X-Chromosomal MicroRNA Genes Implicates Shared Key MicroRNAs in Intellectual Disability. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 67, n. 2, p. 295–304, 2019.

GONG, A. Y. et al. MicroRNA-221 controls expression of intercellular adhesion molecule-1 in epithelial cells in response to *Cryptosporidium parvum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3, p. 397–403, 2011.

GOODMAN, S. R. et al. Minireview Multiomic candidate biomarkers for clinical manifestations of sickle cell severity : Early steps to precision medicine. v. 241, p. 772–781, 2016.

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

HARRIS, T. A. et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 5, p. 1516–1521, 2008.

HERRICK, J. Peculiar Elongated and Sickle-Shaped Red Blood Corpuscles in a Case of Severe Anemia. **Arch Intern Med (Chic)**, v. 6, n. 5, p. 517–521, 1910.

HILLIARD, L. M. et al. Red blood cell transfusion therapy for sickle cell patients with frequent painful events. n. August, 2018.

HIRTZ, D.; KIRKHAM, F. J. Pediatric Neurology Sickle Cell Disease and Stroke. **Pediatric Neurology**, v. 95, p. 34–41, 2019.

HOPPE, C. et al. Simvastatin reduces vaso-occlusive pain in sickle cell anaemia: a pilot efficacy trial. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 4, p. 620–629, 2017.

HU, G. et al. miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon- γ -induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 298, n. 4, p. G542–G550, 2010.

HUA, S. Targeting sites of inflammation : intercellular adhesion molecule-1 as a target for novel inflammatory therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 1–6, 2013.

HUNEINI, M. AL et al. Increased Vasoocclusive Crises in “ O ” Blood Group Sickle Cell Disease Patients : Association with Underlying Thrombospondin Levels. p. 1–8, 2017.

INGRAM, V. M. ABNORMAL HUMAN HAEMOGLOBINS. III THE CHEMICAL DIFFERENCE BETWEEN NORMAL AND SICKLE CELL HAEMOGLOBINS V. **Biochimica Et Biohysica Acta**, v. 3, p. 1–10, 1959.

INGWERSEN, J. et al. Natalizumab restores aberrant miRNA expression profile in multiple sclerosis and reveals a critical role for miR-20b. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 2, n. 1, p. 43–55, 2015.

JAIN, S.; BAKSHI, N.; KRISHNAMURTI, L. Acute Chest Syndrome in Children with Sickle Cell Disease. **Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology**, v. 30, n. 4, 2017.

JUNG, H. J.; SUH, Y. Circulating miRNAs in Ageing and Ageing-Related Diseases. **J Genet Genomics**, v. 41, n. 9, p. 465–472, 2015.

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

KAJAJI, G. A. L. et al. Blood - based microRNAs as diagnostic biomarkers to discriminate localized prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and allow

- cancer - risk stratification. **Oncology Letters**, v. 16, p. 1357–1365, 2018.
- KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.
- KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 2017.
- KATO GJ, HEBBEL RP, STEINBERG MH, G. M. Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. **Am J Hematol**, v. 84, n. 9, p. 618–625, 2009.
- KATO, M.; CASTRO, N.; NATARAJAN, R. MicroRNAs: Potential Mediators and Biomarkers of Diabetic Complications. **Free Radic Biol Med**, v. 64, p. 85–94, 2014.
- KAUL, D. K.; FINNEGAN, E.; BARABINO, G. A. Sickle Red Cell–Endothelium Interactions. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 97–111, jan. 2009.
- KEIKHAEI, B. et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European Cytokine Network**, v. 24, n. 1, p. 45–52, 2013.
- KELEKU-LUKWETE, N. et al. Amelioration of inflammation and tissue damage in sickle cell model mice by Nrf2 activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 39, p. 12169–74, 2015.
- KHALYFA, A. et al. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes. **British Journal of Haematology**, v. 174, n. 5, p. 786–798, 2016.
- KIM, S. W. et al. Expression analysis of miR-221-3p and its target genes in horses. **Genes & Genomics**, v. 41, n. 4, p. 459–465, 2019.
- KOHAMA, I. et al. An Insight into the Roles of MicroRNAs and Exosomes in Sarcoma. **Cancers**, v. 11, p. 1–21, 2019.
- KONG, D. et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–16, 2018.
- KOSARAJU, V. et al. Imaging of musculoskeletal manifestations in sickle cell disease patients. **The British Journal of Radiology**, v. 90, n. 1073, p. 20160130, maio 2017.
- LAMONTE, G. et al. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into Plasmodium falciparum inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 2, p. 187–199, 2013.
- LARSSON, F. et al. Acute splenic sequestration in children with sickle cell disease--an overview. **Lakartidningen**, 2016.
- LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 22–32, 2009.
- LEIDINGER, P. et al. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. **Genome Biology**, v. 14, n. 7, p. R78, 2013.

LETTRE, G. The Search for Genetic Modifiers of Disease Severity in the β - Hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor Perspect Med**, 2012.

LEWIS, K. A.; JORDAN, H. R.; TOLLEFSBOL, T. O. Effects of SAHA and EGCG on Growth Potentiation of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2019.

LI, Z. et al. Circulating microRNA signature of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. **Cell Proliferation**, n. October, p. e12418, 2017.

LIANG, Y. et al. MiR-221 / 222 promote epithelial-mesenchymal transition by targeting Notch3 in breast cancer cell lines. **NPJ Breast Cancer**, p. 1–9, 2018.

LIU, C. W. et al. Resveratrol attenuates ICAM-1 expression and monocyte adhesiveness to TNF- α -treated endothelial cells: Evidence for an anti-inflammatory cascade mediated by the MIR-221/222/AMPK/p38/NF- κ B pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–14, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LU, Y. et al. A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribo- nucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 3, p. 1–10, 2009.

LUCAS, K.; RAIKHEL, A. S. Insect miRNAs: Biogenesis, Expression Profiling, and Biological Functions. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 1, p. 24–38, 2014.

MBURU, J.; ODAME, I. Sickle cell disease : Reducing the global disease burden. **Int J Lab Hematol**, v. 41, p. 82–88, 2019.

MCGANN, P. T.; NERO, A. C.; WARE, R. E. Current management of sickle cell anemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 8, p. 1–17, 2013.

MEIER, E. R.; FASANO, R. M.; LEVETT, P. R. A systematic review of the literature for severity predictors in children with sickle cell anemia. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 65, p. 86–94, 2017.

MENESES, J. V. L. et al. Autologous stem cell-based therapy for sickle cell leg ulcer: a pilot study. **British Journal of Haematology**, v. 175, n. 5, p. 949–955, 2016.

MENG, X. et al. MicroRNA-126-5p downregulates BCAR3 expression to promote cell migration and invasion in endometriosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2019.

MONCHANIN, G. et al. Plasma levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in athletes with sickle cell trait with or without α -thalassemia during endurance exercise and recovery. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 40, n. 2, p. 89–97, 2008.

MONTGOMERY, R. L. et al. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. **EMBO Mol Med**, v. 6, n. 10, p. 1347–1356, 2014.

MORETTI, F.; THERMANN, R.; HENTZE, M. W. Mechanism of translational

regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. **Rna**, p. 2493–2502, 2010.

MORRONE, K. A. et al. **Sickle Cell Disease and Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. [s.l.: s.n.].

MURAKAMI, K.; MIYAGISHI, M. Tiny masking locked nucleic acids effectively bind to mRNA and inhibit binding of microRNAs in relation to thermodynamic stability. **Biomedical Reports**, v. 2, p. 509–512, 2014.

NAYMAGON, L.; PENDURTI, G.; BILLETT, H. H. Acute splenic sequestration crisis in adult sickle cell disease: A report of 16 cases. **Hemoglobin**, v. 39, n. 6, p. 375–379, 2015.

NOLAN, V. G. et al. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease data from the Cooperative Study for Sickle. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3264–3267, 2005.

NOUBOUOSSIE, D.; KEY, N. S.; ATAGA, K. I. Coagulation abnormalities of sickle cell disease: Relationship with clinical outcomes and the effect of disease modifying therapies. **Blood Reviews**, v. 30, n. 4, p. 245–256, 2016.

O'REILLY, S. MicroRNAs in fibrosis: Opportunities and challenges. **Arthritis Research and Therapy**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2016.

OLEJNICZAK, M.; KOTOWSKA, A.; WLODZIMIERZ, Z. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 177–191, 2018.

OLIVARES-SILVA, F. et al. Heparan sulfate potentiates leukocyte adhesion on cardiac fibroblast by enhancing Vcam-1 and Icam-1 expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 3, p. 831–842, 2018.

OWUSU-ANSAH, A. et al. Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease HHS Public Access. **Transl Res**, v. 167, n. 1, p. 281–297, 2016.

PAIKARI, A.; SHEEHAN, V. A. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, 2017.

PATTERSON, G. D. et al. Recurrent Acute Chest Syndrome in Pediatric Sickle Cell Disease: Clinical Features and Risk Factors. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 40, n. 1, p. 51–55, 2018.

PECKER, L. H.; LITTLE, J. Clinical Manifestations of Sickle Cell Disease Across the Lifespan. In: **Sickle Cell Disease and Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 3–39.

PEÑA-CANO, M. I. et al. Deregulated microRNAs and Adiponectin in Postmenopausal Women with Breast Cancer. **Gynecol Obstet Invest**, p. 1–9, 2019.

PENG, J. et al. miR-221 negatively regulates inflammation and insulin sensitivity in white adipose tissue by repression of sirtuin-1 (SIRT1). **Journal of cellular biochemistry**, v. 1, n. December, 2017.

PETERSON, S. M. et al. Common features of microRNA target prediction tools. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. FEB, p. 1–10, 2014.

- PICCIN, A. et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anemia and possible treatment. **Eur J Haematol.**, v. 102, n. 4, p. 319–330, 2019.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.
- PIETY, N. Z. et al. Validation of a Low-Cost Paper-Based Screening Test for Sickle Cell Anemia. **PLoS ONE**, p. 1–17, 2016.
- PURI, L. et al. State of the Art Management of Acute Vaso-occlusive Pain in Sickle Cell Disease. **Pediatric Drugs**, p. 1–14, 2017.
- QUINN, C. T. et al. Prognostic significance of early vaso-occlusive complications in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 40–45, 2006.
- QUINN, C. T.; MILLER, S. T. Risk factors and prediction of outcomes in children and adolescents who have sickle cell anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, n. 6 SPEC.ISS., p. 1339–1354, 2004.
- RAMOS, T. N.; BULLARD, D. C.; BARNUM, S. R. ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. **J Immunol**, v. 192, n. 10, p. 4469–4474, 2014.
- ROGERS, K.; CHEN, X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. **The Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2383–2399, 2013.
- ROTH, P. et al. Differentially regulated miRNAs as prognostic biomarkers in the blood of primary CNS lymphoma patients. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 3, p. 382–390, fev. 2015.
- SAKI, N. et al. MicroRNA Expression in beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease: A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. **Cell journal**, v. 17, n. 4, p. 583–592, 2016.
- SCHLESINGER, M.; BENDAS, G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)—An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 2504–2514, 2015.
- SENET, P. et al. Factors predictive of leg-ulcer healing in sickle cell disease: a multicentre, prospective cohort study*. **Br J Dermatol**, v. 177, p. 15–16, 2017.
- SEOK, H. et al. Evaluation and control of miRNA - like off - target repression for RNA interference. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 5, p. 797–814, 2017.
- SHAO, N. et al. miR-221-5p enhances cell proliferation and metastasis through post-transcriptional regulation of SOCS1 in human prostate cancer. **BMC Urol**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- SHARMA, R. et al. Breast cancer metastasis : Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. **Cellular Oncology**, v. 40, n. 3, p. 199–208, 2017.
- SILVA, I. V. et al. Sickle cell disease in children: Chronic complications and search of predictive factors for adverse outcomes. **European Journal of Haematology**, v. 94, n. 2, p. 157–161, 2015.
- SOARES, A. C. N. et al. Follow-up of children with hemoglobinopathies diagnosed by the Brazilian Neonatal Screening Program in the State of Pernambuco. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n. 4, p. 250–255, 2014.

- SONG, J. et al. Potential value of miR-221/222 as diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers for diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.
- SPARKENBAUGH, E.; PAWLINSKI, R. Prothrombotic aspects of sickle cell disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, p. 1307–1316, 2017.
- STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 87, n. 8, p. 795–803, 2012.
- STEPIEN, A. et al. Posttranscriptional coordination of splicing and miRNA biogenesis in plants. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 8, n. 3, p. 1–23, 2016.
- STROUSE, J. J.; LANZKRON, S.; URRUTIA, V. The epidemiology, evaluation and treatment of stroke in adults with sickle cell disease. **Expert Rev Hematol**, v. 4, n. 6, p. 597–606, 2011.
- SUÁREZ, Y. et al. Cutting Edge: TNF-Induced MicroRNAs Regulate TNF-Induced Expression of E-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Endothelial Cells: Feedback Control of Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 1, p. 21–25, 2010.
- SUI, X. et al. Resveratrol Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Endothelial Cells via the Activation of PI3K / Akt by miR-126. **J Atheroscler Thromb**, v. 21, n. 2, p. 108–118, 2014.
- SUN, X. et al. MicroRNA-181b regulates NF- κ B – mediated vascular inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 1973–1990, 2012.
- SUN, Y. et al. miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 3, p. 1483–1489, 2010.
- SUNG, H. et al. The effects of wild bitter melon fruit extracts on ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cells of C57BL/6J mice and microRNA-221/222 knockout mice: Involvement of the miR-221/-222/PI3K/AKT/NF- κ B pathway. **Phytomedicine**, v. 42, p. 90–99, 2018.
- TANTAWY, A. A. et al. Surfactant protein D as a marker for pulmonary complications in pediatric patients with sickle cell disease : Relation to lung function tests. **Pediatr Pulmonol**, v. 54, n. 5, p. 610–619, 2019.
- TAVAZOIE, S. F. et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 147–152, 2009.
- TE WINKEL, M. L. et al. Management and treatment of osteonecrosis in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 99, n. 3, p. 430–436, mar. 2014.
- TERPOS, E. et al. Increased circulating VCAM-1 correlates with advanced disease and poor survival in patients with multiple myeloma: reduction by post-bortezomib and lenalidomide treatment. **Blood cancer journal**, v. 6, n. 5, p. e428, 2016.
- THEIN, M. S.; IGBINWEKA, N. E.; THEIN, S. L. Sickle cell disease in the older adult. **Pathology**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2017.
- THEIN, S. L. Genetic Basis and Genetic Modifiers of β -Thalassemia and Sickle Cell

Disease. In: [s.l: s.n.]. v. 1013p. 27–57.

TOLEDO, S. L. D. O. et al. Sick cell disease: Hemostatic and inflammatory changes, and their interrelation. **Clinica Chimica Acta**, v. 493, n. January, p. 129–137, 2019.

TOYAMA, K. et al. Identification of circulating miRNAs differentially regulated by opioid treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

TRAN, H.; GUPTA, M.; GUPTA, K. Targeting novel mechanisms of pain in sickle cell disease. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 130, p. 546–555, 2017.

TSUCHIYA, S. et al. MicroRNA-338-3p and microRNA-451 contribute to the formation of basolateral polarity in epithelial cells. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 11, p. 3821–3827, 2009.

UEDA, R. et al. Dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 26, p. 10746–10751, jun. 2009.

UNDI, R. B.; KANDI, R.; GUTTI, R. K. MicroRNAs as haematopoiesis regulators. **Advances in Hematology**, v. 2013, n. Figure 2, 2013.

USAMI, Y. et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 3, p. 568–578, 2013.

VATHIPADIEKAL, V. et al. A Candidate Trans-acting Modulator of Fetal Hemoglobin Gene Expression in the Arab-Indian Haplotype of Sickle Cell Anemia: —ANTXR1 Variants and HbF— Vinod. **Am J Hematol**, v. 91, n. 11, p. 1118–1122, 2017.

WANG, J.-N. et al. Negative Association of Circulating MicroRNA-126 with High-sensitive C-reactive Protein and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Patients with Coronary Artery Disease Following Percutaneous Coronary Intervention. **Chinese Medical Journal**, v. 129, n. 23, p. 2786, 2016.

WARE, R. E. et al. Sick cell disease. **The Lancet**, v. 6736, n. 17, p. 1–13, 2017.

WITKOWSKI, M. et al. Micro-RNA-126 reduces the blood thrombogenicity in diabetes mellitus via targeting of tissue factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 6, p. 1263–1271, 2016.

WONKAM, A. et al. Clinical and genetic factors are associated with pain and hospitalisation rates in sickle cell anaemia in Cameroon. **British Journal of Haematology**, v. 180, n. 1, p. 134–146, 2017.

XIAO, X.; MURK, D. D.; CHENG, C. Y. Intercellular adhesion molecules (ICAMs) and spermatogenesis. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 2, p. 167–186, 2013.

XU, J. et al. miR-221 / 222-Mediated Inhibition of Autophagy Promotes Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 3, p. 1–12, 2019.

XU, L.; YANG, B.; AI, J. MicroRNA Transport : A New Way in Cell Communication †. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 8, p. 1713–9, 2013.

YAMAKUCHI, M. MicroRNAs in Vascular Biology. **International Journal of**

Vascular Medicine, v. 2012, p. 1–13, 2012.

YANG, L. et al. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α – activated vascular endothelium under flow. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 584–593, 2019.

YANG, W. Z. et al. MiR-126 overexpression inhibits high glucose-induced migration and tube formation of rhesus macaque choroid-retinal endothelial cells by obstructing VEGFA and PIK3R2. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 31, n. 4, p. 653–663, 2017.

YE, J. et al. LncRBA GSA5, up-regulated by ox-LDL, aggravates inflammatory response and MMP expression in THP-1 macrophages by acting like a sponge for miR-221. **Experimental Cell Research**, v. 369, n. 2, p. 348–355, 2018.

YU, G. I.; JUN, S. E.; SHIN, D. H. Associations of VCAM-1 gene polymorphisms with obesity and inflammation markers. **Inflammation Research**, v. 66, n. 3, p. 217–225, 2017.

ZHAN, M. et al. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 7, p. 1015–1025, jul. 2007.

ZHANG, J. et al. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 1, p. 136–140, 2008.

ZHANG, J. et al. Exosome and Exosomal MicroRNA : Trafficking , Sorting , and Function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 13, p. 17–24, 2015.

ZHANG, K. et al. Decreased epithelial and sputum miR-221-3p associates with airway eosinophilic inflammation and CXCL17 expression in asthma. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 315, p. 253–264, 2018.

ZHANG, L. et al. Silence of lncRNA CHRF protects H9c2 cells against lipopolysaccharide-induced injury via up-regulating microRNA-221. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 107, p. 43–50, 2019a.

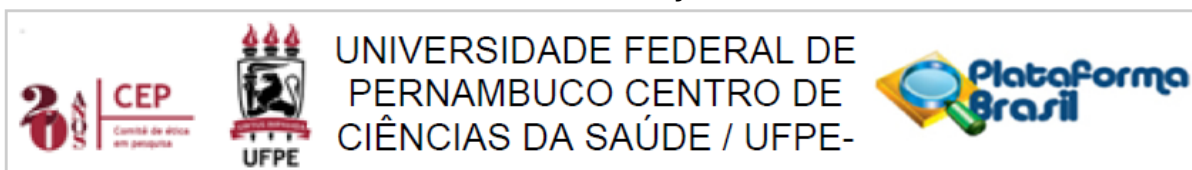
ZHANG, L. et al. RhoA / rho-kinase , nitric oxide and inflammatory response in LIMA during OPCABG with isoflurane preconditioning. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 9, p. 1–7, 2019b.

ZHAO, D. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications miR-221 activates the NF- κ B pathway by targeting A20. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 472, p. 11–18, 2016.

ZHAO, D. et al. miR-221 alleviates the inflammatory response and cell apoptosis of neuronal cell through targeting TNFAIP2 in spinal cord ischemia – reperfusion. **NeuroReport**, v. 29, p. 655–660, 2018.

ZHONG, L.; SIMARD, M. J.; HUOT, J. Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 8, p. 4070–4084, 2018.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da Expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 com as Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme

Pesquisador: Rodrigo Marcionilo de Santana

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 74775817.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.472.666

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Dentro do contexto técnico-científico o trabalho está bem elaborado. Diante do exposto trata-se de uma pesquisa com relevância para os pacientes, para as áreas médica e afins. Este trabalho se justifica porque a utilização de biomarcadores como os microRNAs podem abrir novas perspectivas para o melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na vaso-oclusão dos pacientes com AF. As exigências foram atendidas satisfatoriamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos encontram-se adequados.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

A Emenda foi analisada e aprovada pelo colegiado do CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 24 de Janeiro de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

ANEXO B - 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 da Expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 com as Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme", que está sob a responsabilidade do pesquisador Rodrigo Marcionilo de Santana (Endereço: Rua Boa Vista, nº 107, Loteamento Duas Unas, Santo Aleixo, Jaboatão dos Guararapes, PE, CEP: 54120-670 – Fone: (81) 98313-7595 – E-mail: digooms2@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra ((81) 99800-8105 - macbezerraufpe@gmail.com)). Também participam desta pesquisa: Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ((81) 99908-9382 - araujoarl@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.

A anemia falciforme é uma doença de grande incidência que altera as hemácias (sangue) e que provoca dores, o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Como benefício indireto, a identificação de alterações genéticas na anemia falciforme permitirá a detecção precoce de algumas manifestações clínicas da doença. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 4 ml de sangue, obtidos usando agulhas e seringas descartáveis. Em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma (mancha roxa) local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha. Para evitar a formação do hematoma deve-se pressionar bem um algodão limpo no local da picada, evitar dobrar o braço e pode-se colocar uma compressa de água morna. O sangue coletado será levado para o laboratório, após a coleta. No laboratório, será realizado as análises moleculares para verificar a presença dos miRNAs na amostra. Pedimos a sua permissão para que possamos ter acesso ao seu prontuário de acompanhamento médico, o qual será necessário para que possamos coletar os dados clínicos e laboratoriais presentes no seu prontuário.

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)

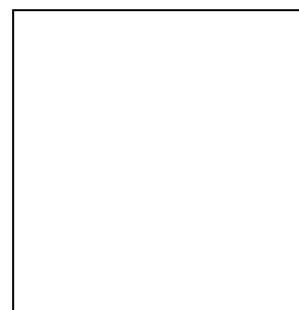
**Avaliação da Expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 com as
Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme**

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 da Expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 com as 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:

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Rodrigo Marcionilo de Santana

Curriculum Vitae

Agosto/2019

Dados pessoais

Nome Rodrigo Marcionilo de Santana

Filiação Marcelo Marcionilo de Santana e Luiza Pereira da Silva

Nascimento 07/08/1993 – Olinda/PE - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
Título: Avaliação da Expressão do miRNA-221 e do miRNA-126 com as Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme,
Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra.
Coorientador: Antonio Roberto Lucena de Araújo.
Coorientador: Luydson Richardson Silva Vasconcelos.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2012 - 2016** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
Título: Avaliação da Atividade Moluscicida do Limoneno sobre a Biomphalaria glabrata.
Orientador: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque.
-

Formação Complementar

- 2017 - 2017** Extensão universitária em V Curso de Interpretação do Hemograma.. (Carga horária: 45h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
- 2017 - 2017** EAD - Doença Falciforme.. (Carga horária: 30h).
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil

Produção

Artigos completos publicados em periódicos

1. BATISTA, THAIS HELENA CHAVES ; SOBREIRA, MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA ; SANTANA, RODRIGO MARCIONILO DE ; ARCANJO,

GABRIELA DA SILVA ; RAMOS, CAMILA MABEL DE ALBUQUERQUE ; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA MARTINS ; ARAUJO, ADERSON DA SILVA ; ANJOS, ANA CLÁUDIA MENDEONÇA DOS ; COSTA, FERNANDO FERREIRA ; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO ROBERTO ; BEZERRA, MARCOS ANDRÉ CAVALCANTI . Interaction between hemoglobin S and N-Baltimore: a case report in Pernambuco, Brazil. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 41, p. 1-4, 2019.

2. ALAGBE, A.E. ; JUSTO JUNIOR, A.S. ; RUAS, L.P. ; TONASSÉ, W.V. ; SANTANA, R.M. ; BATISTA, T.H.C. ; DOMINGOS, I.F. ; ARAUJO, A.S. ; BEZERRA, M.A.C. ; SANTOS, M.N.N. ; BLOTTA, M.H.S.L. . Interleukin-27 and interleukin-37 are elevated in sickle cell anemia patients and inhibit in vitro secretion of interleukin-8 in neutrophils and monocytes. *CYTOKINE*, v. 107, p. 85-92, 2018.

Trabalhos publicados em anais de congressos (Resumo)

1. TONASSE, W. V. ; CHENOU, F. ; DOMINGOS, I. F. ; BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; ARAUJO, A. S. ; BEZERRA, M. A. C. ; COSTA, F. F. ; SONATI, M. F. ; SANTOS, M. N. N. . Correlations between hemolysis and hypercoagulability markers and effects of hydroxyurea therapy in sickle cell patients. In: 23rd Congress of the European Hematology Association, 2018, Estocolmo. 23rd Congress of the European Hematology Association, 2018. v. 2. p. 668-668.

2. TONASSE, W. V. ; CHENOU, F. ; DOMINGOS, I. F. ; BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; ARAUJO, A. S. ; BEZERRA, M. A. C. ; COSTA, F. F. ; SONATI, M. F. ; SANTOS, M. N. N. D. . Hemolysis and coagulation markers in sickle cell anemia patients with and without hydroxyurea therapy. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2018, 2018, São Paulo. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 2018. v. 40. p. 50-50.

3. TONASSE, W. V. ; CHENOU, F. ; DOMINGOS, I. F. ; BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; ARAUJO, A. S. ; BEZERRA, M. A. C. ; COSTA, F. F. ; SONATI, M. F. ; SANTOS, M. N. N. D. . Hemolysis and hypercoagulability markers in sickle cell anemia patients with and without hydroxyurea therapy. In: 11ª semana de pesquisa da FCM - UNICAMP, 2018, Campinas. 11ª semana de pesquisa da FCM - UNICAMP, 2018.

4. BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; ARCANJO, G. S. ; RAMOS, C. M. A. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; XAVIER, A. L. ; MENEZES, A. G. ; ANJOS, A. C. D. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . INTERAÇÃO ENTRE AS HEMOGLOBINAS S E N-BALTIMORE: UM RELATO DE CASO. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2017, 2017, Curitiba. *ANAIS DA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA*, 2017.

5. ALBUQUERQUE, F. P. ; BATISTA, T. H. C. ; BATISTA, J. V. G. F. ; ARCANJO, G. S. ; SANTANA, R. M. ; ALBUQUERQUE, D. M. ; COSTA, F. F. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO DO GENE UGT1A1 NA INCIDÊNCIA DE COLELITÍASE EM PACIENTES COM ANEMIA

FALCIFORME. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2017, 2017, Curitiba. ANAIS DA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2017.

6. ARCANJO, G. S. ; DOMINGOS, I. F. ; MEDEIROS, R. L. B. ; BATISTA, J. V. G. F. ; BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; ANJOS, A. C. D. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS T-786C E VNTR (4A/B) NO GENE ENOS COM O DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA CEREBROVASCULAR EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba. ANAIS DA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2017.

7. SOUZA, M. B. S. ; MARTINS, D. A. P. ; SANTANA, R. M. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; RAMOS, C. M. A. ; XAVIER, A. L. ; ARCANJO, G. S. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BMP6 COM O DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba. ANAIS DA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2017.

8. ALAGBE, A. E. ; JUNIOR, A. S. J. ; RUAS, L. P. ; TONASSE, W. V. ; DOMINGOS, I. F. ; SANTANA, R. M. ; ARAUJO, A. S. ; BEZERRA, M. A. C. ; SANTOS, M. N. N. D. ; BLOTTA, M. H. S. L. . EVALUATION OF INTERLEUKIN-27 AND INTELEUKIN-37 IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS AND THEIR EFFECT ON NEUTROPHILS AND MONOCYTES. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017, 2017, Curitiba. ANAIS DA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 2017.

Apresentações de Trabalho

1. SOBREIRA, M. J. V. C. ; BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Caracterização gênica e proteica de citocinas inflamatórias em pacientes com anemia falciforme durante e após crise vaso-oclusiva. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

2. SANTANA, R. M.; BATISTA, T. H. C. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA-221 E DO miRNA-126 COM AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3. BATISTA, T. H. C. ; SANTANA, R. M. ; SOBREIRA, M. J. V. C. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS MIR21 E MIR-130A NA OCORRÊNCIA DE ÚLCERAS MALEOLARES EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos

1. VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO miRNA-221 E DO miRNA-126 COM AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME. 2018. (Outra).
2. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2017. AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BMP6 COM O DESENVOLVIMENTO DE OSTEONECROSE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME. 2017. (Congresso).
3. II Simpósio Nacional de Hematologia Oncologia D'Or.. 2017. (Simpósio).

Organização de eventos

1. SANTANA, R. M.. VII Jornada de Pós Graduação em Genética. 2017. (Outro).