

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

JÉSSICA VITÓRIA GADELHA DE FREITAS BATISTA

**ANÁLISE DA MODULAÇÃO CLÍNICA DA ANEMIA FALCIFORME POR
VARIANTES NO GENE *KLOTHO***

Recife

2021

JÉSSICA VITÓRIA GADELHA DE FREITAS BATISTA

**ANÁLISE DA MODULAÇÃO CLÍNICA DA ANEMIA FALCIFORME POR
VARIANTES NO GENE *KLOTHO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.
Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Batista, Jéssica Vitória Gadelha de Freitas
Análise da modulação clínica da Anemia Falciforme por variantes no gene *Klotho* /
Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista. – 2021.

120 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araujo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Anemia Falciforme. 2. Genética. 3. Polimorfismo (genética). I. Bezerra, Marcos André Cavalcanti (orientador). II. Araujo, Antonio Roberto Lucena (coorientador). III. Título.

616.152

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-126

JÉSSICA VITÓRIA GADELHA DE FREITAS BATISTA

**Análise da Modulação Clínica da Anemia Falciforme por Variantes no Gene
*KLOTHO***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovada em: 31/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Juan Luiz Coelho da Silva (Examinador Externo)
National Institute of Health

Prof. Dr. Magnun Nueldo Nunes dos Santos (Examinador Externo)
Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e oportunidade de acesso à educação;

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós Graduação em Genética pela oportunidade de fazer parte da Instituição;

Agradeço ao meu orientador Professor Marcos André e ao meu coorientador Professor Antonio Roberto por terem me orientado para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Professor Marcos André especialmente por ter aberto as portas do grupo de Pesquisa em Hemoglobinopatias e ter compartilhado comigo tantos ensinamentos sobre a Anemia Falciforme, foi uma grande oportunidade e me trouxe até aqui;

Agradeço aos meus professores da Pós Graduação em Genética pelos ensinamentos passados e que contribuíram para o meu caminho na pós-graduação e também aos meus professores da graduação na UFRN que me permitiram chegar até aqui;

Agradeço à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho;

Agradeço aos colegas do laboratório que me fizeram companhia em tantos momentos. Especialmente a Aleide Melo, amiga especial que caminhou ao meu lado sempre me apoiando; a Gabriela Arcanjo pela amizade nesta caminhada e participação importante para o desenvolvimento do trabalho; a Igor Domingos pela ajuda sempre presente; a Matheus Bezerra pelas conversas e apoio; e também a Jéssica Oliveira e Marianny pela amizade e ombro amigo;

Agradeço à minha família pelo estímulo sempre presente para que eu pudesse me dedicar aos estudos, especialmente aos meus pais Eugênio e Leodegaria, aos meus irmãos, e à minha tia Ana Lúcia e minha avó Genny, essas últimas com participação fundamental em minha formação pessoal e profissional desde minha infância até a vida adulta, assim como Ivalda e Luciana e meus tios;

Agradeço a Carlos Eduardo pelo companheirismo em todo esse processo, tão importante para que eu pudesse alcançar este objetivo e também a Tereza por todo o acolhimento e preocupação;

Agradeço às minhas amigas de Natal por todo apoio durante este meu processo (em especial a Alélia, Amanda, Annara, Clara, Daphne, Emannuely,

Émille, Ingrid, Isadora, Jéssica, Lívia, Luana, Nayana, Rafaela e Viviane) e também aos amigos que Recife me deu que me acompanharam nesta caminhada;

Agradeço a Patrícia, dona Carmen, seu Edwards, Nadja, Neyla, Gabriela e Carol pela amizade formada no LabCen;

Agradeço aos funcionários do Hemope que foram tão importantes no meu processo de coleta de informações e amostras dos pacientes;

Agradeço aos pacientes com anemia falciforme que aceitaram participar e fizeram deste estudo possível;

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente permitiram que esta conquista fosse alcançada.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é marcada pela heterogeneidade fenotípica. Por isso, são realizados estudos que buscam moduladores genéticos da doença. Um dos potenciais moduladores é o *KLOTHO* (*KL*), importante na biologia do óxido nítrico e expressão de moléculas de adesão. Neste trabalho, objetivou-se genotipar, por PCR em tempo real, os polimorfismos em *KL* rs211239, rs685417, rs1207568 e rs9536314 e analisar a associação com as principais complicações da AF: acidente vascular cerebral (AVC), osteonecrose, úlceras de perna, priapismo, síndrome torácica aguda e crises vaso-oclusivas (CVOs). Objetivou-se também avaliar a dosagem da proteína KL solúvel utilizando a metodologia de ELISA em indivíduos com AF com e sem osteonecrose e úlceras de perna e com os diferentes genótipos de rs1207568 e rs9536314. Para análise dos polimorfismos rs211239 e rs685417 foram incluídos 588 indivíduos com AF. *KL* rs211239 mostrou-se associado com CVOs; rs685417, com AVC, priapismo, número de complicações e com uma menor incidência de priapismo em um menor intervalo de tempo ($P < 0,05$). *KL* rs1207568 e rs9536314 foram genotipados para 689 indivíduos e não mostraram associação com as complicações ($P > 0,05$). A dosagem de KL foi feita em 46 indivíduos e mostrou-se aumentada em indivíduos com osteonecrose e naqueles com o genótipo selvagem (GG) para o polimorfismo rs1207568 ($P < 0,05$). Percebe-se que *KL* pode ser um modulador da doença, sendo interessante que mais estudos sejam desenvolvidos para ampliar as investigações.

Palavras-chave: rs211239; rs685417; rs9536314; rs1207568; Klotho Solúvel; Moduladores genéticos.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is marked by phenotypic heterogeneity. Therefore, studies are carried out that look for genetic modulators of the disease. One of these potential modulators is *KLOTHO* (*KL*), which is important in the biology of nitric oxide and expression of adhesion molecules. This study aimed to genotype, by real-time PCR, polymorphisms in *KL* rs211239, rs685417, rs1207568 and rs9536314 and analyze the association with the main complications of SCA: stroke, osteonecrosis, leg ulcers, priapism, acute chest syndrome and vaso-occlusive crises (VOCs). The objective was also to evaluate the dosage of soluble KL (sKL) protein using the ELISA methodology in individuals with SCA with and without osteonecrosis and leg ulcers and with the different genotypes of rs1207568 and rs9536314. For the analysis of the rs211239 and rs685417 polymorphisms, 588 individuals with SCA were included. *KL* rs211239 has been shown to be associated with VOCs; rs685417, with stroke, priapism, number of complications and with a lower incidence of priapism in a shorter time interval ($P < 0.05$). *KL* rs1207568 and rs9536314 were genotyped for 689 individuals and showed no association with complications ($P > 0.05$). The sKL dosage was performed in 46 individuals and showed to be increased in individuals with osteonecrosis and in those with the wild genotype (GG) for the rs1207568 polymorphism ($P < 0.05$). It is noticed that KL can be a modulator of SCA, and it is interesting that more studies are developed to expand the investigations.

Keywords: rs211239; rs685417; rs9536314; rs1207568; Soluble Klotho; Genetic Modulators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

- Figura 1 – Fisiopatologia da AF: a desoxigenação leva à polimerização da Hb S e consequente falcização do eritrócito. Os eritrócitos falcizados desencadeiam a oclusão microvascular através de interações com neutrófilos e plaquetas ativadas e adesão ao endotélio vascular, levando à isquemia e hipóxia tecidual e lesão de reperfusão. A hemólise leva à liberação de hemoglobina que é oxidada e libera heme. O heme funciona como um padrão molecular associado a danos que ativa as células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de NETs via ligação com o TLR4. *NET: neutrophil extracellular trap*, ROS: Espécies reativas do oxigênio, VWF: fator de von Willebrand, TLR4: receptor do tipo Toll 4 (Adaptado de Williams and Thein 2018). 26
- Figura 2 – Complicações clínicas da AF. Complicações agudas são aquelas que necessitam de rápido atendimento médico. Complicações crônicas são resultantes de sucessivas lesões teciduais ao longo do tempo. Com o aumento da expectativa de vida dos indivíduos com AF há aumento dos relatos de casos de indivíduos com tais complicações (Adaptado de Kato et al., 2018). 29
- Figura 3 – Gene KL e seus transcritos. KL é constituído por cinco éxons e quatro íntrons. Pode sofrer splicing alternativo gerando transcritos que não são traduzidos. O transcrito canônico codifica a proteína KL transmembrana que tem dois domínios homólogos KL1 e KL2. Ela pode ser clivada com o corte α , que gera um KL solúvel de “comprimento total”, enquanto a clivagem do corte β resulta em KL1 e KL2 separados (Adaptado de Cheikhi et al., 2019). 33
- Figura 4 – Base estrutural da formação do complexo FGF23- α KL-Receptor de FGF (FGFR1c). O domínio KL2 da proteína α -KL tem uma protuberância, a RBA (do inglês, *Receptor-binding-arm*) que se liga ao domínio D3 do receptor de FGF-23, FGFR1c. Essa interação 34

permite a ligação do FGF-23 com afinidade (Adaptado de Kuro-o 2019).

Figura 5 – Ligação de FGF23 ao complexo FGFR-KL levando à fosforilação da AKt e consequente fosforilação da eNOS, levando à produção de NO (Adaptado de Richter et al., 2016). 36

ARTIGO 1 - ASSOCIATION OF *KLOTHO* POLYMORPHISMS WITH CLINICAL COMPLICATIONS OF SICKLE CELL ANEMIA

Figure 1 – Cumulative incidence of priapism according to genotype of KL rs685417 ($P = 0.036$). Individuals with GG genotype had a lower incidence of priapism (58.5%) when compared to individuals of GA and AA genotypes (87.5%). 54

ARTIGO 2 - INCREASED SERUM LEVELS OF SOLUBLE KLOTHO IN BRAZILIAN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA WITH OSTEONECROSIS

Figure 1 – Serum sKL levels in SCA individuals with and without osteonecrosis (ON). Individual with osteonecrosis had higher sKL levels than control group ($P = 0.007$). 72

Figure 2 – (a) Serum sKL levels in SCA individuals with rs1207568 GG and GA+AA genotypes. Individuals with GG genotype had higher sKL levels than those with GA and AA individuals ($P = 0.025$). (b) The association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.013$). 72

Figure 3 – (a) Serum sKL levels in SCA individuals with and without HU therapy do not show statistically significant difference ($P = 0.0457$). (b) The lack of association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.500$). 72

Figure 4 – (a) Serum sKL levels in SCA individuals with and without LUs do not show statistically significant difference ($P = 0.109$). (b) The 73

lack of association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.149$).

Figure 5 – (a) Serum sKL levels in SCA individuals with genotypes TT and TG for KL rs9536314 do not show statistically significant difference ($P = 0.257$). (b) The lack of association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.397$). 73

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - ASSOCIATION OF *KLOTHO* POLYMORPHISMS WITH CLINICAL COMPLICATIONS OF SICKLE CELL ANEMIA

Table 1 – Association analysis of SCA complications (stroke, osteonecrosis, leg ulcers, and ACS) with clinical, laboratory and genetic variables.	55
Table 2 – Association analysis of SCA complications (priapism, VOCs per year, and number of complications) with clinical, laboratory and genetic variables.	56
Table 3 – Linear regression to predict vaso-occlusive crisis (VOCs) in patients with SCA.	57
Table 4 – Binary logistic regression to predict priapism in patients with SCA.	57
Table 5 – Binary logistic regression to predict stroke in patients with SCA.	57

ARTIGO 2 - INCREASED SERUM LEVELS OF SOLUBLE *KLOTHO* IN BRAZILIAN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA WITH OSTEONECROSIS

Table 1 – Association analysis of SCA complications with clinical, laboratory and genetic variables.	74
Table 2 – Association analysis of SCA complications with clinical, laboratory and genetic variables.	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$\alpha^{3.7Kb}$	Deleção $\alpha^{3.7kb}$
β^s	Cadeia globínica beta com alteração para a formação da Hb S
A	Adenina
aa	Aminoácido
ADAM-10	Do inglês, <i>disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
ADAM-17	Do inglês, <i>disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17</i>
ADP	Adenosina difosfato
AF	Anemia falciforme
AST	Aspartato transaminase
AVC	Acidente vascular cerebral
BACE-1	Beta-secretase 1
BAN	Bantu
BCAM-1	Do inglês, <i>Basal cell adhesion molecule 1</i>
BEN	Benin
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
C	Citosina
CAM	Camarões
CAR	República Centro-Africana
CD36	Cluster de diferenciação 36

CD47	Cluster de diferenciação 47
CEP	Comitê de ética em pesquisa
cGMP	Do inglês, <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CSSCD	Do inglês, <i>cooperative study of sickle cell disease</i>
CVO	Crise vaso-oclusiva
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTC	<i>Doppler</i> transcraniano
eDAMPS	Do inglês, <i>Erythroid damage-associated molecular pattern molecules</i>
FGF-23	Do inglês, <i>fibroblast growth factor 23</i>
FOXO	Do inglês, <i>mammalian forkhead box O</i>
G	Guanina
GBD	Do inglês, <i>Global Burden of Disease</i>
Glu	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina A
Hb A ₂	Hemoglobina A ₂
HbAS	Indivíduo traço falciforme
<i>HBB</i>	Gene da subunidade beta da hemoglobina
Hb C	Hemoglobina C
Hb D	Hemoglobina D
Hb F	Hemoglobina fetal
<i>HBG 2</i>	Gene da hemoglobina subunidade gama 2

Hb S	Hemoglobina S
HbSS	Indivíduo homozigoto para a mutação β^s
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HPLC	Do inglês, <i>high performance liquid cromatography</i>
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Do inglês, <i>intercelular adhesion molecule 1</i>
ICAM-4	Do inglês, <i>intercelular adhesion molecule 4</i>
IGF-1	Do inglês, <i>insulin growth factor 1</i>
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de potássio
<i>KL</i>	<i>Klotho</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LUs	<i>Leg ulcers</i>
MAF	Do inglês, <i>minor allele frequency</i>
MnSOD	Do inglês, <i>mitochondrial antioxidant manganese superoxide dismutase</i>
Nº	Número
NCBI	Do inglês, <i>national center for biotechnology information</i>
NET	Do inglês, <i>neutrophil extracellular trap</i>
NO	Do inglês, <i>nitric oxide</i>
O ₂	Oxigênio
OD	<i>Odds ratio</i>
ON	<i>Osteonecrosis</i>
Pb	Pares de base
PBS	Do inglês, <i>phospate buffered saline</i>

PCR	Do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Fosfatidilserina
RBC	Do inglês, <i>red blood cells</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Do inglês, <i>Real time - quantitative polymerase chain reaction</i>
S	<i>Sense</i>
SAU	Saudi-Árabe ou Árabe-índiano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEN	Senegal
sKL	<i>Soluble Klotho</i>
SNP	Do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
STOP	Do inglês, <i>Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia</i>
T	Timina
TaqPol	Taq Polimerase
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR4	Do inglês, <i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	Do inglês, <i>tumor necrosis factor α</i>
TRPV5	Do inglês, <i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 5</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Val	Valina

VCAM-1 Do inglês, *vascular cell adhesion protein 1*

VCM Volume corpuscular médio

WBC Do inglês, *white blood cells*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 ANEMIA FALCIFORME.....	21
2.1.1 Histórico e Etiologia.....	21
2.2.2 Epidemiologia.....	22
2.2.3 Fisiopatologia	23
2.2.4 Complicações clínicas	26
2.2 KLOTHO.....	32
2.2.1 Funções.....	33
2.2.2 Estudos de associação com polimorfismos em <i>KL</i>	38
2.2.3 Dosagem da proteína KL solúvel	41
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 ASSOCIATION OF <i>KLOTHO</i> POLYMORPHISMS WITH CLINICAL COMPLICATIONS OF SICKLE CELL ANEMIA.....	44
5 INCREASED SERUM LEVELS OF SOLUBLE KLOTHO IN BRAZILIAN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA WITH OSTEONECROSIS.....	58
6 DISCUSSÃO GERAL	77
7 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A NORMAS DA REVISTA "ANNALS OF HEMATOLOGY"	96
ANEXO B PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	106
ANEXO C CURRICULUM VITAE (LATTES).....	110

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é a doença monogênica mais comum no mundo, sendo causada pela herança em homozigose do gene mutado que codifica a cadeia globínica β que leva à produção da hemoglobina anormal S (Hb S). Devido à anormalidade da Hb S, indivíduos com AF podem apresentar diversas complicações nos mais diversos órgãos e tecidos do corpo. Porém, mesmo sendo uma doença monogênica, é observado que há indivíduos que cursam com quadros clínicos graves, com constantes internações e intervenções médicas e outros que apresentam clínica branda, sendo necessário apenas o acompanhamento ambulatorial.

Essa heterogeneidade fenotípica despertou a necessidade de entender quais outros fatores estariam modulando o surgimento desses sub-fenótipos. Percebeu-se que fatores econômicos e sociais estavam associados: indivíduos com maior acesso à assistência médica e maiores níveis de escolaridade estariam menos susceptíveis a algumas complicações da doença, porém apenas esses fatores não explicam a heterogeneidade observada. Surgiu, então, a necessidade de investigar moduladores genéticos que poderiam estar impactando na evolução clínica da doença.

Assim, genes que estão envolvidos em vias importantes na fisiopatologia da doença passaram a ser investigados. Dois moduladores já são bem aceitos na literatura: a co-herança com a talassemia- α e as concentrações de hemoglobina F (Hb F). Indivíduos com AF que também são talassêmicos- α tendem a apresentar menos complicações de cunho hemolítico e indivíduos com maiores concentrações de Hb F tendem a apresentar menos complicações de modo geral, uma vez que a sua presença inibe a polimerização e precipitação da Hb S que é o ponto chave da fisiopatologia da doença, levando à hemólise e vaso-occlusão.

Porém, assim como as variáveis socioeconômicas, apenas a talassemia- α e a Hb F não são suficientes para indicar o prognóstico do paciente. Assim, torna-se necessário encontrar mais moduladores genéticos que possam indicar ao clínico o prognóstico do indivíduo e então orientar as condutas clínicas a fim de prevenir o surgimento de complicações e também que possam vir, se possível, a se tornar alvos terapêuticos.

Neste contexto, surge o gene *KLOTHO* (*KL*), descoberto em 1997, quando foi associado com fenótipo de envelhecimento precoce em camundongos *knockout* para o referido gene. Esses animais apresentavam diversas complicações, dentre elas osteoporose e menor expectativa de vida. Com o passar dos anos, muitos estudos foram desenvolvidos a fim de entender as funções das proteínas oriundas deste gene. Dentre as diversas funções descritas estão: atuação como correceptor obrigatório do hormônio ósseo FGF-23, sendo, assim, importante para a homeostase mineral; importante na biossíntese do óxido nítrico (NO), importante vasodilatador; atuação no combate ao estresse oxidativo; inibição da via Wnt/ β -catenina; e atuação nos processos inflamatórios.

Com tantas funções importantes descritas, *KL* tornou-se alvo de estudo em diferentes contextos clínicos, seja pela análise de polimorfismos, pela expressão de seu mRNA ou de sua proteína. Na AF, alguns estudos avaliando diferentes polimorfismos foram descritos a fim de encontrar algum que estivesse associado com diferentes complicações. Com a dosagem da proteína, entretanto, não há nenhum relato na literatura até o momento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ANEMIA FALCIFORME

2.1.1 Histórico e Etiologia

Em 1910, um trabalho científico que deu início a uma longa jornada de pesquisas foi publicado: o pesquisador James Herrick publicou um relato de caso no qual descrevia um jovem negro procedente da Ilha de Granada que apresentava clínica inconclusiva com dores generalizadas, úlceras de perna, icterícia e palidez. O mais peculiar é que este jovem apresentava eritrócitos alongados, em forma de foice. Com o passar do tempo, alguns outros estudos observaram que cerca de 8% dos indivíduos afro-americanos apresentavam eritrócitos com forma de foice em seus estiraços sanguíneos, porém ainda não se sabia o que causava esta condição (HERRICK, 1910).

Em 1947, aqui no Brasil, o estudante de medicina Jessé Accioly descreveu, observando 21 famílias na Bahia, que a doença era transmitida hereditariamente, sendo a herança do tipo autossômica recessiva. Embora não tenha tido grande prestígio à época, hoje é sabido que foi pioneiro nessa descrição (Accioly 1947).

Em 1949, Pauling e colaboradores, ao avaliarem indivíduos com essas características clínicas e laboratoriais, perceberam que, durante a eletroforese de hemoglobina, as amostras deles apresentavam perfis de corrida diferentes daquelas de indivíduos tomados como controles. Assim, esta doença passou a ser a primeira historicamente descrita como causada por um defeito molecular (PAULING et al., 1949).

Já em 1956, o pesquisador Ingram descobriu que esta alteração no padrão eletroforético da hemoglobina provinha de uma troca de um ácido glutâmico (glu) por uma valina (val) na cadeia globínica β que hoje sabemos que é devida a uma mutação que leva à troca de uma adenina (A) por uma timina (T) no sexto códon do gene que codifica a cadeia globínica β (*HBB*; β^S GAG→GTG; glu6val), de localização cromossômica 11p15.5 (INGRAM, 1956).

Nestes 111 anos, muitas respostas foram trazidas: esta doença descrita pela primeira vez em 1910 é chamada doença falciforme (DF) por causa dos eritrócitos em forma de foice observadas nestes indivíduos. A mutação que leva à troca de aminoácido (aa) e, conseqüentemente, à formação de uma hemoglobina defeituosa gera o que se chama de hemoglobina S (Hb S, formada pelas cadeias globínicas

$\alpha_2\beta^S_2$), que substitui a hemoglobina normal A (Hb A, formada pelas cadeias globínicas $\alpha_2\beta_2$), que é a predominante em indivíduos sem hemoglobinopatias (KATO et al., 2018). Indivíduos que herdaram um alelo que codifica a Hb S e outro que codifica a Hb A (HbAS) são chamados de portadores do traço falciforme, não tendem a apresentar complicações clínicas, sendo importante o diagnóstico para casos de aconselhamento genético e para haver precauções em situações de baixa disponibilidade de oxigênio, como mergulhos em águas profundas e atividades de intenso esforço físico (ARAÚJO et al., 2004). Quando o alelo que codifica a Hb S é herdado em associação com outro alelo que codifica outra hemoglobina variante (como, por exemplo, Hb C, Hb D, Hb S, talassemia- β), chama-se genericamente de doença falciforme (DF), com gravidade variável. No caso da herança em homozigose da Hb S, tem-se um termo para essa condição: anemia falciforme (AF), que tende a ser o quadro mais grave dentre as DFs (BALLAS, 2018; WARE et al., 2017).

2.2.2 Epidemiologia

Estudos sugerem que a mutação que leva à codificação da Hb S surgiu na África e na Ásia, tendo se mantido evolutivamente por, naqueles indivíduos heterozigotos, fornecer proteção contra a malária (indivíduos HbAS apresentam até 90% menos chances de apresentarem a forma grave da malária) (KATO et al., 2018; PAGNIER et al., 1984).

Com o tráfico negreiro que levava Africanos para trabalhos forçados ao redor do mundo, houve a presença da mutação nos mais diversos locais do Globo (AURICCHIO et al., 2007; HUTTLE et al., 2015; KATO et al., 2018). De acordo com a Carga Global de Doença (*Global Burden of Disease – GBD*), 3,2 milhões de pessoas vivem no mundo com DF, 43 milhões são portadoras do traço e 176.000 pessoas morrem por ano em decorrência de complicações da doença (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

O Brasil é um dos países que mais recebeu Africanos para serem escravizados, cerca de 4 milhões. Por causa desse fato, é um país com alta presença de Hb S. Estima-se que cerca de 5-6% da população brasileira seja portadora do alelo β^S (ADORNO et al., 2004; AURICCHIO et al., 2007), sendo cerca

de 7 milhões de portadores (HbAS) e cerca de 30.000 indivíduos com AF (CANÇADO; JESUS, 2007).

Devido à alta prevalência e à gravidade que pode existir no curso clínico da doença, em 2001 o Ministério da Saúde instituiu, mediante a Portaria nº 822/01, a pesquisa de hemoglobinopatias como parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal, permitindo, a partir de então e da adesão dos Estados, o levantamento epidemiológico mais detalhado. Conforme esperado, percebeu-se que Estados que contaram de maneira mais expressiva com a população Africana em sua formação étnica apresentavam maiores números de indivíduos com DF, como é o caso de Pernambuco, onde 1 em cada 23 nascidos vivos possui o traço falciforme e 1 em cada 1.400 nasce com DF (BRASIL, 2012; CANÇADO; JESUS, 2007). Por outro lado, Estados que contam com menor participação Africana em sua formação étnica apresentam menos indivíduos portadores do alelo β^s , como é o caso de Santa Catarina, em que dados de 2014 mostram uma proporção de 1 em cada 13.500 indivíduos (BRASIL, 2014).

2.2.3 Fisiopatologia

A fisiopatologia da AF é complexa, conta com a participação de diversos componentes circulatórios (eritrócitos, reticulócitos, leucócitos, plaquetas e endotélio) e com a ocorrência simultânea e retroalimentada de hemólise, vaso-oclusão, inflamação e coagulação (KATO et al., 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019; ZAGO; PINTO, 2007).

O evento chave que desencadeia todos os demais é a polimerização da Hb S, que acontece quando ela é submetida a fatores como, por exemplo, a desoxigenação (CESAR et al., 2019; ZAGO; PINTO, 2007). Quando desoxigenada, essa hemoglobina expõe seus motivos hidrofóbicos de valina e polimeriza-se no eritrócito, deformando-o e deixando-o rígido. Dentre as formas que a célula pode assumir, a mais comum delas é a forma de foice – o que dá nome à doença. Essa falcização é reversível, de modo que, após reoxigenada, a célula volta à sua forma normal. Mas sucessivos ciclos de desoxigenação e reoxigenação levam à falcização irreversível e danos irreparáveis à membrana. Quanto maior a concentração de Hb S no interior da célula, mais polimerização acontecerá (por isso, indivíduos com AF tendem a apresentar clínica mais grave). Outros fatores que estão associados com a

polimerização da Hb S são pH, temperatura, quadro de hidratação do organismo e concentração de hemoglobina fetal (Hb F) – no caso desta última, sua concentração é inversamente proporcional à taxa de polimerização. A partir dessa polimerização da Hb S, há um desencadeamento de fenômenos que levam a danos a todo o organismo (BALLAS, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019; ZAGO; PINTO, 2007).

Um desses fenômenos é a intensa hemólise. Devido aos danos à membrana, os eritrócitos de indivíduos com AF circulam por um tempo cerca de 75% menor do que o tempo de vida normal, que é de 90 a 120 dias, levando os pacientes a cursarem com um quadro de anemia crônica (KATO et al., 2018; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). Essa hemólise pode acontecer tanto de maneira intra como extravascular. A porção extravascular representa cerca de 70% da hemólise registrada nos pacientes, acontecendo devido à captura dos eritrócitos danificados pelo sistema reticulo endotelial. Os outros 30% são derivados da hemólise intravascular, que acontece mediada pelo sistema complemento, o qual detecta alterações na membrana (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; TAYLOR et al., 2008).

Quando intravascular, o processo hemolítico leva à liberação dos componentes que até então estavam dentro da célula e causam danos diretos aos vasos e à disfunção endotelial, como hemoglobina, arginase e ADP. Esses produtos da hemólise são considerados padrões moleculares associados a danos originários de eritrócitos (do inglês, *eDAMPS - Erythroid damage-associated molecular pattern molecules*) (GLADWIN; OFORI-ACQUAH, 2014).

A hemoglobina livre liberada no plasma sequestra o óxido nítrico (NO), forma metehemoglobina e nitrato, gera espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais danificam o endotélio e estimulam um processo inflamatório. Além disso, ela é oxidada e deixa o grupamento heme e o ferro livres, os quais ativam um processo inflamatório estéril. A arginase reage com a L-arginina, que é substrato para formação de NO. O ADP e a hemoglobina estimulam a ativação plaquetária e a coagulação (GAARDER et al., 1961; GLADWIN; OFORI-ACQUAH, 2014; HELMS et al., 2013; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019; VILLAGRA et al., 2007).

Percebe-se então que a hemólise intravascular compromete de maneira importante a biodisponibilidade de NO (o qual é importante para regular o tônus

vascular, a função plaquetária, inflamação, expressão de moléculas de adesão endoteliais e combater o estresse oxidativo), estimula danos endoteliais, inflamação e ativação plaquetária (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017; STEINBERG, 2008a).

Além da hemólise, a vaso-oclusão é outro evento importante para os danos fisiológicos observados nos pacientes com AF. Como o próprio nome diz, trata-se da oclusão de vasos, levando a infartos teciduais em diversos órgãos, que conta com a participação dos eritrócitos, reticulócitos, endotélio, leucócitos e das plaquetas, que se ligam entre si e obstruem os vasos (CONRAN; COSTA, 2009; WARE et al., 2017; ZAGO; PINTO, 2007).

Os eritrócitos falcizados apresentam em sua face externa da membrana diversas moléculas que em condições normais estariam em sua face interna, como, por exemplo, a fosfatidilserina (PS), a molécula de adesão intercelular 4 (ICAM-4) e molécula de adesão celular basal-1 (BCAM-1/Lu), as quais os tornam mais adesivos entre si, com outras células e com o endotélio. Além disso, devido à hemólise crônica, os pacientes com AF cursam com importante reticulocitose e os reticulócitos são, por si só, mais adesivos, uma vez que expressam mais moléculas adesivas, como o CD36. Devido à ativação endotelial, há maior expressão de moléculas adesivas, como a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e também das selectinas plaquetárias e endoteliais. Além disso, como citado anteriormente, há um quadro inflamatório e de ativação plaquetária, o que faz com que leucócitos e plaquetas também contribuam para a oclusão (BISWAL et al., 2019; CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Todos esses eventos ocorrem de maneira simultânea, retroalimentam-se e são, ao mesmo tempo, causa e efeito uns dos outros (Figura 1). Eles levam às diversas complicações clínicas que os indivíduos estão susceptíveis a apresentar como consequência da doença.

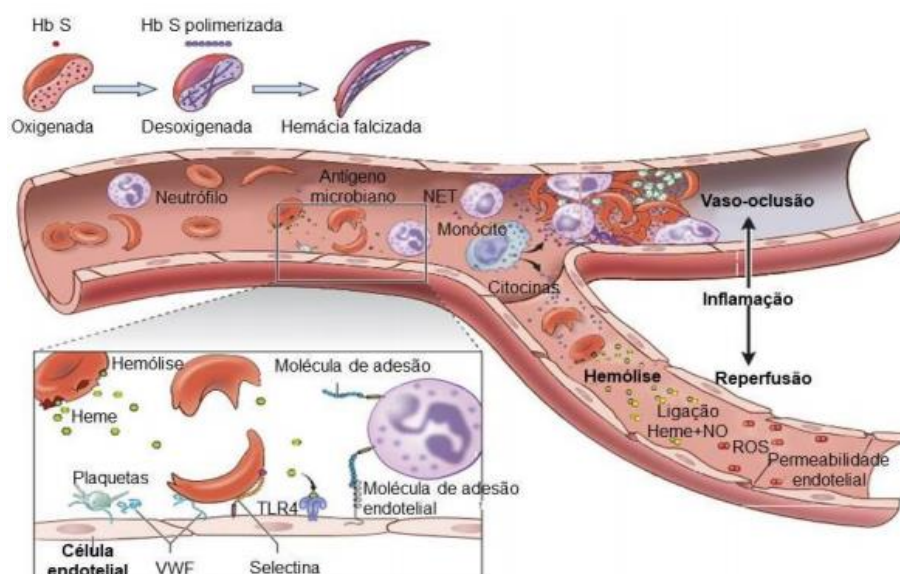


Figura 1 - Fisiopatologia da AF: a desoxigenação leva à polimerização da Hb S e consequente falcização do eritrócito. Os eritrócitos falcizados desencadeiam a oclusão microvascular através de interações com neutrófilos e plaquetas ativados e adesão ao endotélio vascular, levando à isquemia e hipóxia tecidual e lesão de reperfusão. A hemólise leva à liberação de hemoglobina que é oxidada e libera heme. O heme funciona como um padrão molecular associado a danos que ativa as células endoteliais, macrófagos e neutrófilos e promove a formação de *NETs* via ligação com o TLR4. *NET*: *neutrophil extracellular trap*, ROS: Espécies reativas do oxigênio, VWF: fator de von Willebrand, TLR4: receptor do tipo Toll 4 (Adaptado de Williams and Thein 2018).

2.2.4 Complicações clínicas

Devido à complexa fisiopatologia, todos os órgãos dos indivíduos com AF podem ser afetados e diversos fenótipos podem surgir. Algumas das complicações que os acometem são eventos agudos e outras são resultado de danos progressivos que ocorrem ao longo do tempo, especialmente com o aumento da expectativa de vida dos indivíduos com AF (WILLIAMS; THEIN, 2018; ZAGO; PINTO, 2007).

Uma das mais importantes complicações apresentadas pelos pacientes são as crises agudas de dor (ou crises vaso-oclusivas, CVOs), que constituem a principal causa de internação hospitalar dos indivíduos com AF (NOVELLI; GLADWIN, 2016; QUINN, 2013). Causada pela oclusão microvascular que leva à isquemia dos tecidos e provoca uma resposta inflamatória aguda, as crises dolorosas atingem diversas regiões do corpo. Crianças entre seis meses e dois anos de idade apresentam frequentemente, nos pés e mãos, episódios dolorosos que são conhecidos como dactilite (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). Essas dores podem ser leves e tratadas com analgesia simples e hidratação, porém há casos de dor intensa

e incapacitante, fazendo necessária a administração de fortes opioides que em alguns casos causam dependência nos pacientes (BALLAS, 2018; WILLIAMS; THEIN, 2018).

A segunda principal causa de hospitalizações nos pacientes com AF e principal causa de óbito (cerca de 9% de mortalidade se não tratada) é a complicação pulmonar conhecida como síndrome torácica aguda (STA) (BALLAS, 2018). De patogênese complexa, pode ser desencadeada por diferentes fatores, como, por exemplo, infecções, infarto na medula óssea esternal, eventos que levem à hipoventilação, crises vaso-oclusivas e hemolíticas e embolismo (FAROOQ; ABU OMAR; SALZMAN, 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). É diagnosticada quando há achado radiográfico de novo infiltrado pulmonar, podendo estar acompanhado de sintomas como febre, tosse e dor torácica (HOWARD et al., 2015).

Outro evento agudo muito comum nos indivíduos com AF é o priapismo, caracterizado como uma ereção peniana prolongada e dolorosa que acontece na ausência de estímulo sexual e acomete até 40% dos homens com a doença (STEINBERG, 2008b). Na maioria dos casos, há veno-oclusão que mantém o sangue nos corpos cavernosos, levando à ereção com dor e, apesar desse evento vaso-oclusivo, a hemólise tem importante participação: a diminuição da biodisponibilidade NO leva à redução de fosfodiesterase-5, a qual, quando presente nas quantidades ideais, inativa o GMP cíclico (cGMP), que é um importante agente causal da ereção peniana (ARDUINI; TROVÓ DE MARQUI, 2018; VICARI; FIGUEIREDO, 2007). Outro achado que sugere relação causal com a hemólise é que os pacientes apresentam elevadas dosagens de marcadores hemolíticos no sangue (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

A fisiopatologia da AF também predispõe um outro evento agudo de grande morbimortalidade: o acidente vascular cerebral (AVC), que pode ser tanto isquêmico (secundário à oclusão de uma artéria) como hemorrágico (causado por rupturas de aneurismas devido ao dano vascular que acontece com o endotélio) (SWITZER et al., 2006). Crianças com AF apresentam até 300 vezes mais chances de desenvolver essa complicação quando comparadas àquelas sem a doença, sendo o AVC responsável por 20% dos óbitos nesses pacientes entre 5 e 10 anos e também o responsável por deixar 70% desses indivíduos acometidos com sequelas cognitivas e motoras (OHENE-FREMPONG et al., 1998).

Além dessas complicações de caráter agudo, também existem aquelas que, devido aos sucessivos episódios vaso-oclusivos e hemolíticos, acometem outras partes do organismo de maneira crônica (ZAGO; PINTO, 2007). Uma delas é a osteonecrose, complicação muito comum em adultos com AF. Devido aos sucessivos episódios de vaso-oclusão na microvasculatura óssea, danos teciduais acontecem e podem evoluir para infartos das superfícies articulares com consequente degeneração e necrose tecidual (SILVEIRA; GUEDES; DALTRO, 2010). No Brasil, cerca de 11,1% dos indivíduos com AF são acometidos, sendo a prevalência aumentada com o aumento da idade (DALTRO et al., 2018). Mais comum na região osteoarticular do quadril, a necrose avascular causa intensas dores que limitam a locomoção do indivíduo e diminuem sua qualidade de vida. O único tratamento disponível é a artroplastia, porém é um procedimento que apresenta alta morbimortalidade e, em muitos casos, requer nova cirurgia em até 10 anos. Pode ser diagnosticada por exames de raio X, porém a melhor técnica é a ressonância magnética (ALMEIDA; ROBERTS, 2005; BEZERRA; DAHER; ROCHA, 2012; MILNER et al., 1991).

Lesões ulcerativas nos membros inferiores (ou úlceras de perna) também são comuns dentre as complicações, acometendo entre 5% e 10% dos adultos, podendo causar muita dor e prejudicar a qualidade de vida (BALLAS et al., 2010). Os sucessivos fenômenos vaso-oclusivos e hemolíticos levam a danos teciduais que podem predispor o surgimento das ulcerações que são mais comuns na região dos maléolos medial e lateral e também na região frontal da perna e calcanhares (MINNITI et al., 2010). A vaso-oclusão, ao causar hipóxia e inflamação, leva a danos teciduais e a intensa hemólise também contribui de maneira importante, uma vez que em outras anemias hemolíticas essa complicação é observada (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; PALADINO, 2007). Além dos fatores internos, fatores externos podem desencadear o aparecimento da lesão inicial, como, por exemplo, picadas de insetos. Por isso, regiões tropicais e precárias condições socioeconômicas também estão associados a maiores índices de indivíduos com as lesões (ALAVI; KIRSNER, 2015).

Esses indivíduos também podem desenvolver complicações cardiovasculares diversas, as quais são atribuídas à anemia hemolítica crônica, a reflexo de alterações pulmonares, aos episódios de isquemia e microinfartos

teciduais e também, em alguns casos, devido ao depósito de ferro associado às transfusões sanguíneas que podem ocorrer com frequência importante em alguns casos (MARTÍN-NÚÑEZ et al., 2014; PAVLÚ et al., 2007). Dentre as alterações que podem surgir, podem ser citadas a cardiomegalia, cardiomiopatia e insuficiência congestiva cardíaca (ICC) (BALLAS et al., 2010). As causas ainda não são bem elucidadas e, além disso, a complicação cardiovascular, apesar de importante na clínica do paciente, é pouco valorizada no contexto geral da doença.

Além dessas complicações supracitadas, a AF pode levar a danos em diversos outros órgãos: os pacientes podem apresentar, por exemplo, danos oculares, auditivos e renais. Na Figura 2 podem ser observadas algumas das complicações que acometem diferentes órgãos e tecidos.

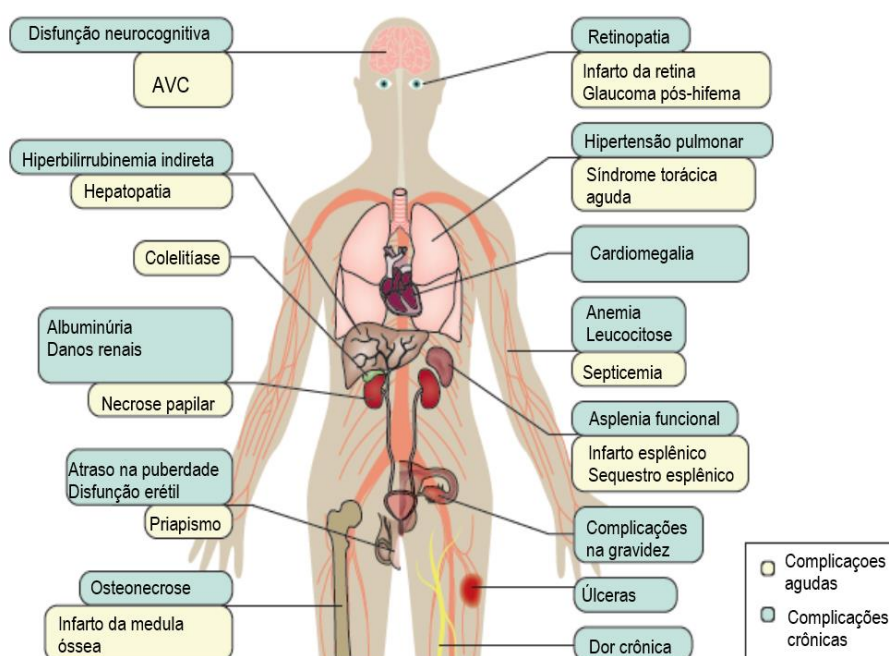


Figura 2 - Complicações clínicas da AF. Complicações agudas são aquelas que necessitam de rápido atendimento médico. Complicações crônicas são resultantes de sucessivas lesões teciduais ao longo do tempo. Com o aumento da expectativa de vida dos indivíduos com AF, há aumento dos relatos de casos de indivíduos com tais complicações (Adaptado de Kato et al., 2018).

Apesar de ser uma condição monogênica, a AF é caracterizada por notável heterogeneidade fenotípica, havendo relatos de cursos clínicos muito distintos entre os indivíduos (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

Parte dessa heterogeneidade dá-se por fatores socioeconômicos: em regiões com melhores condições sociais, a mortalidade infantil foi bem superada e a expectativa de vida é maior (CHOU; FASANO, 2016). Em Londres, por exemplo, a

expectativa de vida de pacientes com DF chega a 67 anos, enquanto em algumas regiões Africanas, a mortalidade infantil permeia entre 50% e 90% das crianças com DF (KATO et al., 2018). No Brasil, a expectativa de vida de pacientes com AF ainda é inferior a 45 anos (MARTINS; MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010).

Essas variáveis sociais, entretanto, não explicam em sua totalidade os diversos fenótipos observados, uma vez que indivíduos inseridos no mesmo contexto social, com acesso aos mesmos cuidados, podem apresentar clínicas discrepantes (SEBASTIANI et al., 2010). Dessa maneira, diversos estudos passaram a avaliar fatores genéticos que poderiam estar associados com essa heterogeneidade fenotípica tão marcante na doença (BALDWIN et al., 2005; JACOB et al., 2017; SEBASTIANI et al., 2010; STEINBERG, 1996; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

Dentre os moduladores genéticos estudados, dois possuem resultados bem debatidos na literatura: os haplótipos β^s , que influenciam na concentração de hemoglobina fetal (Hb F), e a co-herança com a talassemia- α (BITOUNGUI et al., 2015; DOMINGOS et al., 2014; HIGGS et al., 1982).

O gene *HBB*, que codifica a cadeia globínica β , está em desequilíbrio de ligação com cinco haplótipos distintos (determinados pelas diferentes combinações entre um grupo de sítios de restrição no *cluster* β). Essas combinações resultam nos cinco haplótipos β^s conhecidos: Árabe-Indiano ou Saudi (ARB ou SAU), Bantu ou República Centro Africana (BAN ou CAR), Benin (BEN), Senegal (SEN) ou Camarões (CAM). Além desses, há um sexto, o haplótipo atípico, que não corresponde a nenhum dos padrões, podendo ocorrer por mutações pontuais que ocorram nos sítios polimórficos de restrição (SHRINER; ROTIMI, 2018; ZAGO et al., 2000). No que diz respeito à origem desses diferentes haplótipos, há duas teorias: a multicêntrica, que defende que houve origem multicêntrica da mutação em diferentes regiões da Ásia e África e, a partir de então, espalhou-se pelos outros continentes (dessa teoria temos os nomes dos haplótipos); e a teoria unicêntrica, que defende que a mutação que leva à síntese da Hb S teve uma única origem e depois passou por outras mutações gerando os haplótipos (BEZERRA et al., 2007; SHRINER; ROTIMI, 2018; ZAGO; PINTO, 2007).

Enquanto a origem dos haplótipos ainda é analisada, é sabido como eles influenciam no fenótipo da AF. Haplótipos que apresentam o sítio de restrição para a

enzima XmnI estão associados com maior produção de cadeias globínicas γ^G e, conseqüentemente, com maiores concentrações de hemoglobina fetal (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$). Quanto mais Hb F o indivíduo com AF apresenta, mais chances de cursar com clínica mais branda existem, uma vez que ela não participa da formação dos polímeros de Hb S e até inibe sua formação (AURICCHIO et al., 2007; FLEURY, 2007; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; XU et al., 2015). Os haplótipos ARB e SEN apresentam maiores concentrações de Hb F, tendendo a cursar com clínica mais branda; haplótipo BEN cursa com concentrações e clínicas intermediárias; e o haplótipo CAR, mais comum na maioria das regiões do Brasil, cursa com menores concentrações e tende a cursar com clínica mais complicada (BELINI JUNIOR et al., 2015; WILLIAMS; THEIN, 2018; ZAGO et al., 2000).

A co-herança com a talassemia- α (hemoglobinopatia que diminui a produção de cadeias globínicas do tipo α) também é um modulador importante na AF. Com essa diminuição de cadeias α , há desbalanço de síntese entre as cadeias α e β e conseqüente diminuição da produção de Hb S. Com menos Hb S, há menor taxa hemolítica (os indivíduos hetero e homozigotos para a deleção do gene α cursam com menores concentrações de marcadores hemolíticos, como lactato desidrogenase, LDH, e bilirrubina indireta, BI) e conseqüente diminuição de frequência de algumas complicações da doença (BELISÁRIO; VIANA, 2011; FERTRIN; COSTA, 2010; STEINBERG; EMBURY, 1986).

Embora bem aceitos na literatura como moduladores da doença, haplótipos β^s e talassemia- α também não são suficientes para explicar a heterogeneidade fenotípica da doença. Diante disso, então, diversos grupos ao redor do mundo passaram a estudar polimorfismos de nucleotídeo único (em inglês, *Single nucleotide polymorphisms*, *SNPs* - mutações que ocorrem com frequência acima de 1% na população) em genes envolvidos em vias importantes na fisiopatologia da doença, como, por exemplo, nas vias de inflamação, de expressão de moléculas de adesão, produção de NO e hemostasia a fim de encontrar mais moduladores da doença e assim poder auxiliar na indicação de prognóstico dos pacientes (FERTRIN; COSTA, 2010; HABARA; STEINBERG, 2016; STEINBERG, 2008b).

2.2 KLOTHO

Em 1997, um grupo de pesquisadores, trabalhando com criação de camundongos transgênicos a partir da inserção de transgene por micro-injeção, produziram animais e um deles, além de não expressar o transgene inserido, ao ser cruzado para gerar homozigotos, gerou descendentes com fenótipos de envelhecimento precoce (apresentavam, por exemplo: distúrbio de marcha, arteriosclerose, osteoporose e atrofia de órgãos) e menor expectativa de vida. Ao analisarem o que poderia ter acontecido, viram que a inserção do transgene havia se dado em uma região promotora de um gene que ainda não havia sido descrito. Dessa maneira, então, nomearam-no como *Klotho*, que na mitologia Grega seria a divindade responsável pelo curso da vida (Clotho) (KURO-O et al., 1997).

Essa descoberta gerou grande interesse científico e diversos grupos passaram a desenvolver pesquisas a fim de entender melhor este gene, seus produtos e suas funções (KATO et al., 2000; KURO-O, 2019; KUROSU et al., 2005; MATSUMURA et al., 1998).

Em 1998, foi identificado o gene *Klotho* humano por Matsumura e cols. Localizado no cromossomo 13, é um gene composto por 5 éxons e 4 íntrons que gera dois transcritos devido a um *splicing* alternativo no éxon 3 (MATSUMURA et al., 1998). Um desses transcritos é um RNA mensageiro (mRNA) que codifica uma proteína de 1012 aminoácidos (aa) e o outro é menor (MATSUMURA et al., 1998). Evidências recentes sugerem que este transcrito menor não chega a ser traduzido, sendo rapidamente degradado (CHEIKHI et al., 2019). Dessa maneira, é a proteína resultante do transcrito maior a responsável pelas funções de *KL*.

Constituída por três domínios, a proteína *KL* tem uma sequência sinalizadora N-terminal, um domínio extracelular que tem duas repetições internas (dois domínios extracelulares homólogos) chamadas *KL1* e *KL2* (ou *KL1* e *KL*) e um pequeno domínio transmembrana (10 aa). Ela é expressa em alguns órgãos e tecidos do corpo, como nos rins, glândula paratireoide e algumas regiões do cérebro (LIM et al., 2015; MATSUMURA et al., 1998). *KL* é alvo de modificações pós-traducionais sendo clivada pelas proteínas *ADAM-10*, *ADAM-17* e *BACE-1*, gerando *KL* solúvel, que pode ser detectado no sangue, na urina e no líquido e atua de modo humoral em todo o organismo (CARARO-LOPES et al., 2017). O “corte α ” leva à clivagem após a

porção transmembrana e o “corte β ”, à clivagem entre os domínios extracelulares KL1 e KL2 (Figura 3) (CHEIKHI et al., 2019; KURO-O, 2019).

É importante ser dito que já foram descritas outras proteínas da mesma família de *KL*, oriundas dos chamados β -*Klotho* e γ -*Klotho*, sendo, por isso, o *Klotho*, em alguns trabalhos, reportado como α -*Klotho* (KURO-O, 2019), que é o foco deste trabalho.

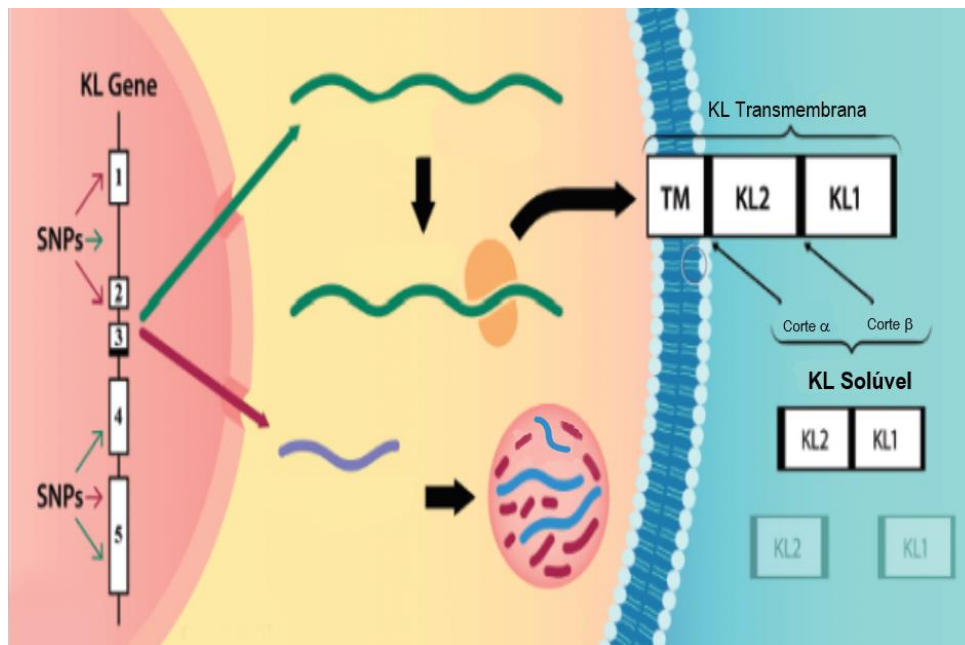


Figura 3 - Gene *KL* e seus transcritos. *KL* é constituído por cinco éxons e quatro íntrons. Pode sofrer *splicing* alternativo gerando transcritos que não são traduzidos. O transcrito canônico codifica a proteína *KL* transmembrana que tem dois domínios homólogos KL1 e KL2. Ela pode ser clivada com o corte α , que gera um *KL* solúvel de “comprimento total”, enquanto a clivagem do corte β resulta em KL1 e KL2 separados (Adaptado de Cheikhi et al., 2019).

2.2.1 Funções

Desde a sua descoberta, *KL* passou a ser bastante estudado e, em virtude disso, passou a ter diversas funções descritas, tal como sua associação com diversas patologias (DALTON et al., 2017; HUM et al., 2017; MENCKE; HILLEBRANDS, 2016).

KL transmembrana atua como correceptor obrigatório do hormônio FGF-23 produzido pelos osteócitos. Essa associação passou a ser avaliada a partir do momento que estudos mostraram que os animais *knockout* para o FGF-23 apresentavam fenótipo semelhante aos animais *knockout* para o *KL* (diminuição no tempo de vida, retardo no crescimento e fenótipos ósseos anormais) (KURO-O et al.,

1997; SHIMADA et al., 2004). Em 2006, Urakawa e cols. mostraram que expressão de KL aumentava a afinidade da ligação de FGF-23 ao seu receptor e que a inibição de KL fazia com que a função de FGF-23 fosse anulada (URAKAWA et al., 2006). Hoje, é sabido que KL promove uma alteração estrutural no receptor de FGF-23 permitindo que a ligação ocorra com maior afinidade (KUROSU; KURO-O, 2009) (Figura 4).

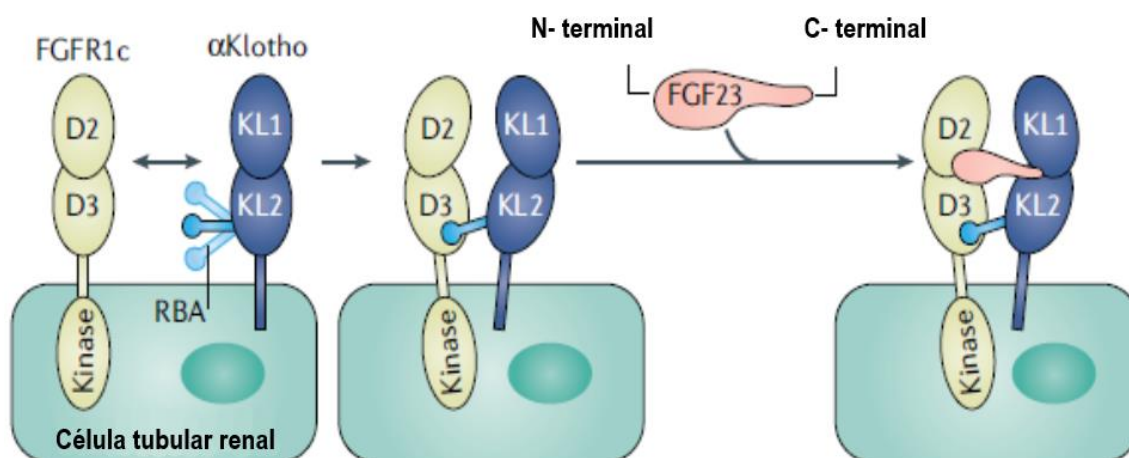


Figura 4: Base estrutural da formação do complexo FGF23-αKL-Receptor de FGF (FGFR1c). O domínio KL2 da proteína α-KL tem uma protuberância, a RBA (do inglês, *Receptor-binding-arm*) que se liga ao domínio D3 do receptor de FGF-23, FGFR1c. Essa interação permite a ligação do FGF-23 com afinidade (Adaptado de Kuro-o 2019).

Devido a essa associação com FGF-23, KL transmembrana está ligado às ações desse hormônio, que são associadas à homeostase do fósforo, vitamina D e cálcio no organismo (OLIVEIRA; MIYSÉS, 2010).

O FGF-23 é um hormônio produzido pelos osteócitos em resposta à ingestão de fosfato. Ao ligar-se aos seus receptores nos rins, FGF-23 induz a internalização dos transportadores NPT2A (do inglês, *sodium dependent phosphate transport protein 2A*) que são responsáveis pela reabsorção de fosfato nas células tubulares proximais. Dessa maneira, FGF-23 é um hormônio fosfatúrico (LIU; QUARLES, 2007; MURER; FORSTER; BIBER, 2004; OLIVEIRA; MIYSÉS, 2010). No que diz respeito à vitamina D (hormônio que age regulando a absorção intestinal e reabsorção intestinal de cálcio e fósforo), o seu aumento na forma ativa leva ao aumento da expressão de FGF-23 e ele, por sua vez, diminui as concentrações séricas da vitamina (KUROSU; KURO-O, 2009). O FGF-23 inibe a 1-α-hidroxilase, que converte vitamina D inativa em ativa e, além disso, aumenta a expressão da 24-

hidroxilase, que converte a forma ativa em forma inativa (KURO-O, 2019). Além dessas funções, FGF-23 também atua aumentando a expressão dos transportadores iônicos de sódio e cálcio nos túbulos convolutos distais renais, aumentando a reabsorção desses íons (KURO-O, 2019). Temos, então, que KL transmembrana está envolvido no metabolismo mineral por ser fundamental na ação do FGF-23.

Outra função descrita de KL é com a biologia do óxido nítrico. Em 1998, Saito e cols. analisaram camundongos selvagens e camundongos *klotho* (assim chamados para fazer referência a animais mutados) homo e heterozigotos e suas respostas à vasodilatação após exposição à acetilcolina. Observaram que os animais *klotho* possuíam vasodilatação comprometida quando comparados aos animais selvagens. Mediram também os metabólitos nitrato e nitrito na urina desses animais e perceberam que os mutados apresentavam concentrações menores do que os selvagens. Outro achado importante foi o de que, após parabiose entre animais selvagens e mutados, os mutados apresentaram melhora na análise de vasodilatação, sugerindo que KL solúvel ao entrar na circulação deles atuou na síntese de NO. Outros estudos reproduziram essas conclusões sobre KL estar associado à biologia do NO, porém não se sabia como esta modulação estaria ocorrendo (NAGAI et al., 2000; NAKAMURA et al., 2002; SAITO et al., 1998, 2000).

Com o passar do tempo e desenvolvimento de novas pesquisas, elucidações de como o KL atua no estímulo à síntese de NO foram surgindo. O KL transmembrana é correceptor obrigatório do FGF-23, de modo que o FGF-23 consegue se ligar ao seu receptor com maior afinidade com a presença de KL. O FGF-23, por sua vez, ao ligar-se ao seu complexo receptor FGFR/KL, fosforila Akt, que fosforila eNOS e leva à síntese de NO (RICHTER et al., 2016). Esses dados foram encontrados também em estudo que mostrou que culturas de células endoteliais expressando KL transmembrana, na presença de FGF-23, produziam mais NO do que aquelas que tinham a expressão de KL subtraída (CHUNG et al., 2017) (Figura 5). Além dessa atuação junto ao FGF-23, KL solúvel também estimula a produção de NO por fosforilar a eNOS na serina da posição 1177 e induzir a expressão da iNOS (SIX et al., 2014).

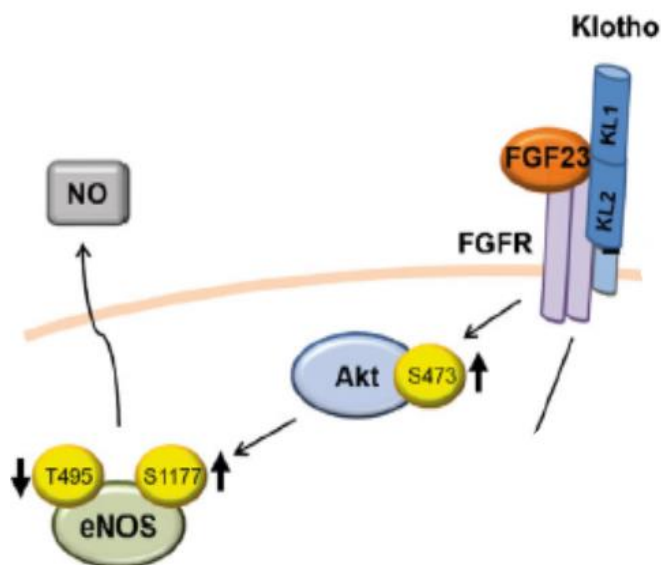


Figura 5 - Ligação de FGF23 ao complexo FGFR-KL levando à fosforilação da Akt e consequente fosforilação da eNOS, levando à produção de NO (Adaptado de Richter et al., 2016).

O KL solúvel, que atua em diversos tecidos do corpo como um hormônio, tem também muitas funções descritas. Uma delas é a inibição da via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), um mecanismo conservado evolutivamente como supressor de envelhecimento (SOERENSEN et al., 2012). KL suprime a auto fosforilação dos receptores de insulina/IGF-1 e assim suprime a cascata de sinalização dessa via, que inclui, por exemplo, a fosforilação de PI3K (KUROSU et al., 2005). Essa ação está ligada à supressão do envelhecimento porque a via de sinalização insulina/IGF-1 faz com que haja inibição dos fatores de transcrição FOXOs, os quais são importantes para a expressão das enzimas antioxidantes catalase e MnSOD₂ (manganese superóxido dismutase 2). Se moderadamente controlada, não há inibição dos FOXOs e a atividade antioxidante não é prejudicada (DALTON et al., 2017). Além dessa atuação antioxidante via insulina/IGF-1, estudos demonstram que KL ativa o fator de transcrição Nfr2, importante na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes, como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (DANESHGAR; DAI, 2020; HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017). Também foi descrito que inibe a via de sinalização Wnt/ β -catenina atuando como antagonista por se ligar a ativadores da via, que é responsável por diversos processos biológicos, como proliferação celular, angiogênese e morte celular. Uma vez não ativada, a β -catenina permanece no citoplasma sendo degradada e não é translocada ao núcleo para estimular a

diferenciação celular. O equilíbrio dessa ativação é importante para evitar o envelhecimento precoce (se ativada de modo exacerbado, pode levar à depleção de células tronco e acelerar o processo de envelhecimento) e outras complicações, como desenvolvimento de tumor (CARRILLO-LÓPEZ et al., 2021; CLEVERS; NUSSE, 2012; KIRSTETTER et al., 2006).

Outra função descrita de KL é sua atuação na supressão de expressão de moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 quando sob estímulo inflamatório. Maekawa e cols. demonstraram que, ao expor células endoteliais de cordão umbilical humano ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), aumentava a expressão de mRNA de VCAM-1 e ICAM-1. Ao administrar essa citocina inflamatória juntamente com KL, observaram redução nessa expressão, indicando que KL estava envolvido na supressão da expressão dessas moléculas de adesão quando existente um estímulo inflamatório. Além disso, perceberam também que na presença de KL a adesão de monócitos às células endoteliais estimulada pelo TNF- α era menor (MAEKAWA et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados também em estudo que mostrou que a presença de KL inibe a ativação de NF κ B e consequentemente a expressão de VCAM-1. Neste estudo, Liu e cols. incubaram células endoteliais de porcos com KL e expuseram a anticorpos xenoreativos e proteínas no complemento para avaliar a ativação inflamatória. Perceberam que o grupo de células com KL apresentaram supressão da indução pró-inflamatória dos anticorpos sobre a produção de VCAM-1 por inibir a ativação de NF κ B (LIU et al., 2017).

Estudos também mostraram que o KL solúvel exerce algumas funções que são exercidas pelo eixo FGFR-FGF-23-KL mesmo na ausência de FGF-23, como regular a atividade dos canais iônicos TRPV5 e ter efeito fosfatúrico (KURO-O, 2019).

Com tantas funções descritas, KL tornou-se alvo interessante em diversos estudos a fim de avaliar sua associação com diferentes desfechos clínicos, como, por exemplo, com doenças ósseas, cardiovasculares, renais e hematológicas (BALDWIN et al., 2005; KITAGAWA et al., 2013; MARTÍN-NÚÑEZ et al., 2014; NOLAN et al., 2006b; OGATA et al., 2002; PACHECO; GONÇALVES, 2014; SOUZA et al., 2015; TANGRI et al., 2011).

No caso da AF, tornou-se um interessante alvo devido a sua relação com a produção do NO, regulação da expressão de moléculas de adesão e controle do estresse oxidativo.

2.2.2 Estudos de associação com polimorfismos em *KL*

Uma maneira de avaliar a associação de um gene com diferentes fenótipos é pelo estudo de polimorfismos e um modo de conduzir tais estudos é selecionando *SNPs* localizados em regiões regulatórias de genes (como região promotora, por exemplo). Há também a possibilidade de selecionar *TagSNPs* – que são polimorfismos em desequilíbrio de ligação com outros, compondo haploblocos (FERTRIN; COSTA, 2010; STEINBERG, 2005). Ao avaliar um *TagSNP*, o pesquisador está avaliando também os *SNPs* em desequilíbrio de ligação com ele e, assim, estuda uma região maior do gene. Outro ponto importante a ser considerado é a *MAF* (do inglês, *minor allele frequency* – frequência do alelo menor) daquela variante na população de estudo, sendo interessante que seja de, no mínimo, 10% nas populações importantes para a formação étnica da coorte estudada (no caso do Brasil, das Africana e Caucasiana) (BORG et al., 2012; CHAMORRO et al., 2016; STRAM, 2004). Esses estudos de associação são bastante difundidos e podem trazer elucidacões para entender a heterogeneidade fenotípica observada em diversas condições clínicas, como a AF (FERTRIN; COSTA, 2010).

Devido ao fato de *KL* ser associado a funções importantes na fisiopatologia da AF (como a biologia do NO, prevenção de estresse oxidativo e controle da expressão de moléculas de adesão), alguns *SNPs* já foram estudados por diversos grupos a fim de analisar suas associações com diferentes complicações da doença (BALDWIN et al., 2005; ELLIOTT et al., 2007; NOLAN et al., 2004, 2006a; SOUZA et al., 2015; ULUG et al., 2009).

Um deles foi o *KL* rs211239 (A>G), que é um *TagSNP* localizado no íntron 1 e que está em desequilíbrio de ligação, nas populações Africana e Caucasiana, com outros nove, que também são intrônicos: *KL* rs118051, *KL* rs541053, *KL* rs480830, *KL* rs211235, *KL* rs503412, *KL* rs480830, *KL* rs527382, *KL* rs34181824, *KL* rs522796, *KL* rs67300527 de acordo com dados retirados do portal Ensembl, que utiliza dados do 1000Genomes. Baldwin e cols. analisaram polimorfismos em diversos genes envolvidos em vias importantes para a fisiopatologia da AF, dentre

eles o *KL*, e sua associação com a frequência de osteonecrose na população estudada (composta por indivíduos Afro-americanos). Dentre os polimorfismos associados com a maior frequência da complicação, estava o *KL* rs211239 quando presente o alelo variante. Uma possível justificativa para essa associação dada pelos autores foi pelo fato de que, sendo *KL* envolvido no metabolismo ósseo, o polimorfismo poderia afetar a expressão da proteína – apesar de não descrever como poderia acontecer – e, assim, contribuir para o fenótipo de desgaste ósseo observado (BALDWIN et al., 2005). Outro estudo que encontrou associação dele com uma complicação da AF foi de Nolan e cols., os quais publicaram que a presença do *SNP* estava associada com maior frequência de priapismo na população estudada, atribuindo a possível explicação no fato de *KL* ser envolvido na biologia do NO (NOLAN et al., 2004). Elliott e cols., por sua vez, não reproduziram os achados de associação desse polimorfismo com priapismo em pacientes também oriundos de hospitais dos Estados Unidos e Ulug e cols., ao estudarem uma população Africana e Afrodescendente, não reproduziram a associação com a osteonecrose (ELLIOTT et al., 2007; ULUG et al., 2009).

Outro *TagSNP* descrito na literatura como associado com algumas complicações da AF foi o *KL* rs685417 (G>A), localizado no íntron 1 e que está em desequilíbrio de ligação com outros 35 *SNPs*, todos localizados em região intrônica – também de acordo com dados retirados do portal Ensembl. Estudos mostraram associação de seu genótipo heterozigoto com maior frequência de osteonecrose e também úlceras de perna em populações Afroamericanas (BALDWIN et al., 2005; NOLAN et al., 2006b). Estudo publicado em 2015 aqui no Brasil, entretanto, não reproduziu o achado de Nolan e cols. com a frequência de úlceras de perna (SOUZA et al., 2015).

Além da AF, há estudos que buscam avaliar a associação de variantes em *KL* com diversos outros fenótipos em diferentes condições clínicas (FRIEDMAN et al., 2009; KURO-O, 2019; LEE; WEBER, 2010; YILMAZ et al., 2015).

Um dos polimorfismos bastante estudados em *KL* é o rs1207568 (G-395A) localizado na região promotora do gene. Devido à localização em uma região reguladora, diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar sua associação com diferentes desfechos clínicos, como, por exemplo, arteriosclerose, hipertensão, densidade mineral óssea, doença coronariana, alteração cognitiva e doença renal

(CORREDOR et al., 2020; ELGHOROURY et al., 2018; IMAMURA et al., 2006; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2007). Em relação às associações encontradas, alguns deles encontraram associação do alelo variante A com fenótipo protetor no caso dos desfechos diversos, a saber: Rhee e cols (2006), por exemplo, encontraram, na população Coreana estudada, que a doença coronariana era menos frequente nos indivíduos carreadores o alelo A, o qual parecia, então, ser protetor; Zhang e cols (2007) encontraram que o alelo selvagem G mostrava-se mais frequente no grupo com maior frequência de osteoartrite em uma população Caucasiana. Por outro lado, outros estudos encontraram resultados que apontavam o alelo G como protetor, como, por exemplo, Donate-Correa e cols (2016) mostraram, ao estudar indivíduos italianos, maior frequência do alelo A em indivíduos com diabetes; outro estudo que encontrou o alelo G como protetor foi de Kamal e cols (2020) que mostrou que a frequência do alelo A era maior em indivíduos com câncer colorretal do que naqueles sem (DONATE-CORREA et al., 2016; KAMAL et al., 2020; RHEE et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Tais resultados podem ser devido aos diferentes *backgrounds* genéticos de cada população ou erros de amostragem ou pelos diferentes critérios nas seleções dos grupos.

Por se tratar de um polimorfismo localizado em região promotora, é importante entender como ele pode influenciar na expressão do RNA mensageiro e consequentemente na expressão protéica de *KL*. Em 2002, Kawano e cols., ao analisarem a mobilidade eletroforética de oligonucleotídeos alelo-específicos sintéticos (representando os alelos G-395 e -395A) incubados com proteínas nucleares (representando fatores de transcrição) perceberam que o alelo G apresentava maior afinidade pelas proteínas, sugerindo que a substituição G>A poderia diminuir a ligação de fatores de transcrição e, consequentemente, a expressão da proteína (KAWANO et al., 2002). Donate-Correa e cols. (2016), ao analisarem a expressão do mRNA de *KL* em amostras teciduais de aorta, encontraram que indivíduos com os genótipos GA e AA expressavam menos do que aqueles com genótipo selvagem corroborando com os achados de Kawano e cols. (2002) (DONATE-CORREA et al., 2016; KAWANO et al., 2002). Embora seja um polimorfismo interessante, ainda não há relatos na literatura dele de associação com fenótipos da AF.

Outro polimorfismo funcional descrito em KL que é bastante estudado é o rs9536314 (T>G), também conhecido como F352V (devido à troca de fenilalanina por valina na posição 352 da proteína). Localizado no éxon 2, esse polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com mais cinco *SNPs*. Desses seis, dois levam à substituição de aminoácido: F352V (rs9536314) e C370S (rs9527025), dando o nome da variante KL-VS (ARKING et al., 2002, 2003). Estudos mostraram que, interessantemente, o genótipo heterozigoto mostrou-se, em diferentes situações clínicas, protetor. Como, por exemplo, o genótipo heterozigoto mostrava-se mais comum em indivíduos idosos (acima de 75 anos), mostrando associação com longevidade; outros estudos mostraram associação desse genótipo com menor frequência de AVC em indivíduos abaixo de 40 anos (ARKING et al., 2002, 2005; INVIDIA et al., 2010). Outros, encontraram que os carreadores do alelo variante, em hetero ou homozigose, mostravam-se protegidos contra retinopatia e doenças cardiovasculares (NZIETCHUENG et al., 2011; SŁOMIŃSKI et al., 2018). Há também estudos que mostram o contrário em outras patologias: que o genótipo selvagem mostra-se protetor contra doença coronariana (ARKING et al., 2003). Percebe-se, então, que há vasta variabilidade nos resultados apresentados na literatura no que diz respeito à análise deste polimorfismo. Assim como o rs1207568 (G>A), embora tenha descrição funcional e associação em diversas patologias, não há relatos publicados na literatura de estudos dele com complicações da AF.

2.2.3 Dosagem da proteína KL solúvel

Além dos estudos de associação com polimorfismos genéticos, pesquisas buscam avaliar dosagens séricas de proteínas com diferentes desfechos clínicos a fim de, assim, indicar se aquele produto gênico está associado com a causa ou consequência de diferentes patologias. Uma maneira de fazer isso é dosando os níveis séricos do alvo de interesse, o que pode ser feito pela metodologia de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Como a proteína KL tem diversas funções descritas, há estudos na literatura que avaliam sua concentração em diferentes contextos clínicos (KITAGAWA et al., 2013; PEDERSEN et al., 2013; SCAZZONE et al., 2020).

Por ter grande expressão e atuação nos rins, há muitos estudos que mostram associações de dosagens séricas de KL com insuficiência renal aguda e

crônica, indicando que à medida que a lesão avança, menores são as dosagens (HUM et al., 2017; ROTONDI et al., 2015; SEIBERT et al., 2017).

Também é um alvo interessante para estudos que envolvem o sistema cardiovascular, de modo que são reportados níveis mais baixos em indivíduos com doenças cardiovasculares e disfunção endotelial (SEMBA et al., 2011; YANG et al., 2020), embora haja relatos também de maior expressão em indivíduos pós infarto do miocárdio (PAULA et al., 2016).

Uma outra linha de estudos que atrai a atenção de pesquisadores é a análise de associação da dosagem de KL com diferentes fenótipos ósseos. Enquanto há alguns estudos que encontram menores níveis de KL em indivíduos com osteoporose do que naqueles com massa óssea normal (ZHENG et al., 2018), há outros que encontram associação de menores concentrações de KL com maior massa óssea (KOMABA et al., 2017; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2020).

Há ainda estudos que buscam associação com vários outros fenótipos, como, por exemplo, nível de cognição, câncer de pulmão e acromegalia e talassemia- β (CARARO-LOPES et al., 2017; HELVACI et al., 2020; PAKO et al., 2020). No caso da talassemia- β , por exemplo, foram descritos menores dosagens de KL nos talassêmicos- β do que nos controles e também foi descrito que os indivíduos talassêmicos- β com histórico de fraturas ósseas tinham dosagem menor do que aqueles sem o histórico (BALDAN et al., 2015). Esses achados, porém, são conflitantes, uma vez que outro estudo não encontrou essa associação quando comparou em indivíduos talassêmicos- β com controles (STEFANOPOULOS et al., 2020).

Entretanto, no que diz respeito à AF, ainda não há estudos publicados que busquem avaliar se há associação dos níveis séricos de KL com os diferentes fenótipos observados na doença, o que é interessante para que se entenda cada vez mais a heterogeneidade fenotípica dessa hemoglobinopatia para poder orientar os clínicos quanto ao prognóstico dos pacientes e, mais importante ainda, para encontrar futuros alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível contribuição de *KL* na modulação clínica da anemia falciforme através da análise de associação dos polimorfismos *KL* rs211239, *KL* rs685417, *KL* rs1207568 e *KL* rs9536314 e da dosagem da proteína *KL* sérica com as principais complicações clínicas da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar se há associação dos polimorfismos estudados (*KL* rs211239, *KL* rs685417, *KL* rs1207568, *KL* rs9536314) com as complicações clínicas observadas;
2. Determinar a dosagem de *KL* solúvel sérico e avaliar a possível associação com as complicações clínicas osteonecrose e úlceras de perna e também com os polimorfismos rs1207568 e rs9536314.

4 ASSOCIATION OF *KLOTHO* POLYMORPHISMS WITH CLINICAL COMPLICATIONS OF SICKLE CELL ANEMIA

Artigo publicado em 14/06/2021 na revista *Annals of hematology* – Fator de impacto: 3,673; Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: B1

doi: 10.1007/s00277-021-04532-w

Jéssica V G F Batista¹, Diego A Pereira-Martins^{1,2}, Diego A Falcão¹, Igor F Domingos^{1,3}, Gabriela S Arcanjo¹, Betânia L Hatzlhofer^{1,4}, Isabel Weinhäuser², Thais Helena Chaves Batista¹, Pablo Ramon Gualberto Cardoso⁵, Ana C dos Anjos⁶, Manuela F Hazin⁶, Maira Galdino da Rocha Pitta⁵, Fernando F Costa⁷, Aderson S Araujo⁶, Antonio R Lucena-Araujo¹, Marcos A Bezerra^{1*}.

Affiliations:

¹Genetics Postgraduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

²Department of Internal Medicine, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil;

³Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil;

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁵Laboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches (LINAT), Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁶Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁷Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

Association of *KLOTHO* polymorphisms with clinical complications of sickle cell anemia

Abstract

Introduction: The clinical and phenotypic heterogeneity of patients with sickle cell anemia (SCA) is influenced by environmental and genetic factors. Several genetic modifiers, such as the *KLOTHO* (*KL*) gene, have been associated with SCA clinical outcomes. The *KL* gene and its encoded proteins are implicated in important biological pathways, which affect the disease's pathophysiology, such as expression of adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1, oxidative stress, and nitric oxide biology. **Methods:** Here, we evaluated the clinical relevance of two polymorphisms found on the *KL* gene (rs685417 and rs211239) in 588 unrelated patients with SCA. Genotyping analyses were performed using the TaqMan system. **Results:** The *KL* rs211239 was associated with increased number of vaso-occlusive crisis (VOCs) per year ($P = 0.001$), while *KL* rs685417 was associated with increased frequency of stroke ($P = 0.034$), priapism ($P = 0.011$), number of complications ($P = 0.019$) and with a lower incidence of priapism ($P = 0.036$). Additionally, the associations with VOCs, stroke, and priapism remained consistent in multivariate analyses ($P < 0.05$). **Conclusion:** Our data highlight the clinical importance of *KL* in SCA.

Keywords: Sickle cell disease; clinical outcome; prognostic markers; *KL* rs211239; *KL* rs685417.

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is the most common monogenic disease worldwide and a public health problem in Brazil ^{1,2}. Clinically, patients with SCA have a large phenotypic heterogeneity due to environmental, socioeconomic, and genetic factors. Identifying genetic modulators that can influence the disease phenotype is important to assist in indicating the prognosis and clinical management of the disease ³. In this context, the *KLOTHO* (*KL*) gene emerges as a potential candidate for SCA clinical complications modulation.

The *KL* gene encodes two proteins: a transmembrane, which acts as a co-receptor for FGF-23, and a soluble protein which acts as a humoral factor. Functionally, these proteins are involved in suppressing adhesion molecules'

expression, reducing oxidative stress and stimulating nitric oxide production. As SCA is marked by the greater adhesiveness of cells that lead to vessel occlusion and intense hemolysis that reduces the bioavailability of nitric oxide ^{4–7}, the influence of *KL* in the pathophysiology of SCA and the association of *KL* polymorphisms with SCA clinical complications, such as osteonecrosis, leg ulcers, and priapism, started to be assessed ^{8–10}. In this study, we evaluated the association of *KL* rs211239 and *KL* rs685417 with the clinical outcome of patients with SCA accompanied in Brazil's northeast region.

Methods

Patients

Between January 2002 to July 2019, 588 hemoglobin SS-genotyped patients (median age: 30 years, range 8 to 67 years, 292 males, 49.7%, diagnosed by hemoglobin electrophoresis and HPLC) were enrolled and regularly followed in a single reference center in northeast Brazil. Clinical and laboratory information were retrospectively obtained from medical records. For those who received hydroxyurea therapy (327/588 of enrolled patients, 55%), data were obtained at the time last seen treatment-free. This study was approved by the Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (CAAE: 58863316.6.3001.5195), and, in accordance with the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients, or, when applicable, their parents or legal guardian.

The patients were divided into subgroups based on their clinical complications, which included leg ulcers, osteonecrosis, stroke, acute chest syndrome (ACS), and priapism. The frequency of these complications was determined by clinical reports from the medical records and imaging tests when applicable.

Cases were classified as follows: patients with ulceration of the skin of the lower legs, especially the medial or lateral surfaces, which failed to heal within a period of two weeks, were categorized as leg ulcers cases ¹¹. Patients who had X-ray radiography and/or magnetic resonance imaging documented necrosis of the hip or shoulder were classified as osteonecrosis patients ¹². Stroke cases were patients who had neurological injury proven by imaging and apparent complaints ^{13,14}. Cases

for ACS were patients who had a pulmonary infiltrate on the chest X-ray ^{15,16}. Finally, priapism cases were male patients who had at least one episode of a painful erection of the penis that lasted more than one hour and was severe enough for the patient to seek medical care ^{17,18}. We also categorized patients by the frequency of vaso-occlusive crises (VOCs) requiring hospitalization per year, number of complications, and cumulative incidence of previously mentioned complications.

Overall, the control group was composed of patients with SCA, over 18-years-old, without the five principal complications mentioned above. Due to the high prevalence of VOCs in our population, the patients were grouped according to the number of events (0 – 2 VOCs / per year, 3 – 5 VOCs / per year, > 6 VOCs / per year) for the analyses ¹⁹.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyping

Peripheral blood samples were collected from all patients, and genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method. *KL* polymorphisms (rs211239, #C_2983117_1_; *KL* rs685417, #C_2983081_10) were genotyped using TaqMan SNPs genotyping following manufacturer's instructions.

Statistical analyses

Patient baseline characteristics were reported descriptively. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Clinical and laboratory features were compared. Fisher's exact test and the Chi-square test were employed for genotype and allele frequency comparisons and to evaluate the Hardy-Weinberg equilibrium. Continuous variables were expressed as median and were compared by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons post-test. All P-values were two-sided with a significance level of 0.05. Univariate and multivariate proportional hazards regression analyses were performed for potential prognostic factors for the complications. Potential prognostic variables considered for model inclusion were quantification of Hemoglobin (Hb), Fetal Hemoglobin (HbF), Lactate dehydrogenase (LDH), Indirect bilirubin, White blood cell (WBC) count, Platelet count, Reticulocyte count, β^S -globin haplotype, and $\alpha^{3.7Kb}$ -thalassemia deletion. Cumulative incidence curves were

constructed reflecting the time of complications development, and the log-rank test was used for comparison of curves.

Results

Overall, 79 (13.4%) patients developed a stroke; 94 (16%) had osteonecrosis; 146 (24.8%) had leg ulcers; 78 of the men (26.7%) presented priapism and 85 patients (14.5%) had ACS. There were 149 patients (25.3%) assigned to the control group (for priapism, 56). Regarding the VOCs, 279 patients had less than 3; 222, between 3 and 6; and 86, more than 6 (one patient did not have this information on the medical records).

The distribution of genotypes for *KL* polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) with a genotypic frequency of AA (225/38.3%), AG (289/49.1%), and GG (74/12.6) for *KL* rs211239; and GG (101/17.2%), GA (285/48.5%) and AA (202/34.4%) for *KL* rs685417. For both polymorphisms, we analyzed the dominant, co-dominant, recessive, and over-dominant association models.

Due to a better fit of data, we used the recessive model for the *KL* rs211239 (A>G) and the dominant model for *KL* rs685417 (G>A) polymorphism. The association analysis results can be seen in Tables 1 and 2, which shows that the number of VOCs was associated with rs211239 ($P = 0.001$). Stroke, priapism, and number of complications were associated with rs685417 ($P = 0.034$; $P = 0.011$, and $P = 0.019$ respectively). Multivariate analyses were also performed and showed that, for *KL* rs211239, the polymorphism remained associated with VOCs' frequency regardless total and HbF levels ($P = 0.033$; Table 3). A similar result was found for *KL* rs685417, which was independently associated with priapism when α -^{3.7}kb-thalassemia was included as a confounder ($P = 0.007$; Table 4). Additionally, *KL* rs685417 was independently associated with stroke, regardless of the level of total Hb, HbF, and WBC count and the presence of α -^{3.7}kb-thalassemia as confounders ($P = 0.029$; Table 5). At last, *KL* rs685417 was also associated with a lower cumulative incidence of priapism (58.5%) compared to patients with *KL* rs685417 GA and AA genotypes (87.5%) ($P=0.036$) (Figure 1).

Discussion

The *KL* gene has been intensively studied since its discovery, and several functions have been attributed to it, such as its impact on nitric oxide biology ^{4,7,20–22} and the expression of endothelial adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 ^{5,23}. In this context, *KL* becomes an important candidate gene to be studied in order to elucidate the phenotypic heterogeneity of SCA, which is associated with complications such as vaso-occlusive and hemolytic phenomena ^{8–10,24}.

Here, we demonstrated an association not previously described between *KL* rs211239 and *KL* rs685417 and SCA clinical complications. Other studies have already associated *KL* rs211239 with priapism ⁹ and osteonecrosis ⁸; *KL* rs685417 was previously associated with osteonecrosis ⁸ and leg ulcers ¹⁰. It must be pointed out that this study and others ^{16,25,26} could not reproduce these associations. However, these three studies ^{8–10}, and ours had different criteria to define the control groups. In all three works, controls were those individuals who did not present only that specific complication (priapism, osteonecrosis, or leg ulcers, depending on the study). In contrast to these studies, our control subjects were individuals who did not develop any of the five main complications. Additionally, only patients in adulthood (over 18 years of age) were included as controls. This age cut-off is important to minimize the chance that individuals placed in this group would present any complications in the near future, although we may not entirely rule out this possibility.

However, it is very important to note that even though we did not reproduce the aforementioned results, we show associations that were not previously described. These findings reported here are very important since VOCs are the leading cause of hospitalization of patients with SCA and stroke is a debilitating condition that leads to many deaths ^{27,28}. In addition to the complications associated with the polymorphisms *KL* rs211239 (A>G) and *KL* rs685417 (G>A), we also observed an association with priapism, a complication that can be so debilitating for patients with SCA, and with an increase in the number of complications, indicating a possible association with disease severity ^{29,30}. Furthermore, to the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate a significant association between *KL* rs685417 GG genotype and the cumulative incidence of priapism.

This approach could be justified since *KL* is involved in NO biology and promotes adhesion molecules' expression, and therefore may influence the appearance of hemolytic and vaso-occlusive clinical complications. At last, both

vaso-occlusive (VOCs) and hemolytic complications (priapism and stroke) were associated with *KL* polymorphisms, which highlights the involvement of *KL* in the biology of both situations.

Based on *KL* functions and several studies that associated *KL* polymorphisms with clinical complications of SCA^{8,9,31}, it is clear that this gene is a strong candidate to modulate SCA pathophysiology. Although we have demonstrated that *KL* polymorphisms are associated with VOCs, stroke, priapism and number of complications in patients with SCA, our data must be considered with caution. Based on our data, it is not possible to state how this modulation functionally occurs. Finally, validations in independent cohorts could significantly strengthen our findings.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant #483714/2013-5). The authors thank to the sickle cell anemia patients and their families who made this research possible.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.V.G.F.B. conceived and designed the study, performed experiments, analyzed and interpreted data, performed the statistical analyses, and drafted the article. D.A.P.M., D.A.F., I.F.D. B.L.H., G.S.A., I.W., T.H.C.B., P.R.G.C. collected data, and reviewed the paper. A.C.A., A.S.A., F.C.F, M.F.H. recruited patients, updated clinical data and reviewed the manuscript. M.G.R.P, A.R.L.A. and M.A.B. gave final approval of the submitted version.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of interest

The authors have no relevant competing interest to declare.

Ethical approval and informed consent

The local research ethics board approved this study (CAAE: 58863316.6.3001.5195) and, in accordance with the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all participants before study commencement. For those under the age of 18 years, informed consent was obtained from their parents or legal guardian.

References

1. Sommer CK, Goldbeck AS, Wagner SC, Castro SM. Triagem neonatal para hemoglobinopatias : experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul , Brasil. *Cad Saude Publica*. 2006;22(8):1709-1714.
2. Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32:46-53. doi:10.1590/S1516-84842010005000020
3. Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, et al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am J Hematol*. 2010;85(1):29-35. doi:10.1002/ajh.21572.Genetic
4. Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, et al. Klotho Protein Protects against Endothelial Dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;248:324-329.
5. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, et al. Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocr*. 2009;35:341-346. doi:10.1007/s12020-009-9181-3
6. Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, et al. Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. *J Biol Chem*. 2005;280(45):38029-38034.
7. Richter B, Haller J, Haffner D, Leifheit-nestler M. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Eur J Physiol*. 2016;468:1621-1635. doi:10.1007/s00424-016-1858-x
8. Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, et al. Association of klotho , bone morphogenic protein 6 , and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood*. 2005;106(1):372-376. doi:10.1182/blood-2005-02-0548.Supported
9. Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2004;128:266-272. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05295.x
10. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, et al. Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *Br J Haematol*. 2006;133(5):570-578.

11. Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK. Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85(10):831-833. doi:10.1002/ajh.21838
12. Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2010;85:6-13. doi:10.1002/ajh.21550
13. Domingos IF, Falcão DA, Hatzlhofer BL, et al. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. *Ann Hematol.* 2014;93(2014):1123-1129. doi:10.1007/s00277-014-2016-1
14. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler. *N Engl J Med.* 1998;339:5-11.
15. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, et al. Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1855-1865.
16. Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Clinical Presentation and Course. *Blood.* 1997;89:1787-1792.
17. Burnett AL, Anele UA, IN T, Al E. Prevention of Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease: Sildenafil: Commentary on: Randomized Controlled Trial of Sildenafil for Preventing Recurrent Ischemic Priapism in Sickle Cell Disease. *Urology.* 2015;86(6):1055-1056. doi:10.1016/j.urology.2015.07.003
18. Vicari P, Figueiredo MS. Priapismo na doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(3):275-278.
19. Belini E, Grünig D, Silva H, et al. Severity of Brazilian sickle cell disease patients : Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells, Mol Dis.* 2015;54(4):321-327. doi:10.1016/j.bcmd.2015.01.011
20. Nagai R, Saito Y, Ohyama Y, et al. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal. *Cell Mol life Sci.* 2000;57:738-746.
21. Majumdar V, Jose D, Christopher R. Influence of Klotho genotypes on plasma NO x levels in South Indian population. *Thromb Res.* 2011;128(3):251-255. doi:10.1016/j.thromres.2011.04.002

22. Chung CP, Chang YC, Ding Y, et al. α -Klotho expression determines nitric oxide synthesis in response to FGF-23 in human aortic endothelial cells. *PLoS One*. 2017;12(5):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0176817
23. Słomiński B, Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwska J, Myśliwiec M. The KL-VS polymorphism of KLOTHO gene is protective against retinopathy incidence in patients with type 1 diabetes. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2018;1864(3):758-763. doi:10.1016/j.bbadis.2017.12.015
24. Fertrin KY, Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease : implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):443-458.
25. Ulug P, Vasavda N, Awogbade M, Cunningham J, Menzel S, Thein SL. Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. *Ann Hematol*. 2009;88:803-805. doi:10.1007/s00277-008-0659-5
26. Souza CRL, Shimmoto MMA, Vicari P, Mecabo G, Arruda MM, Figueiredo MS. Klotho gene polymorphisms and their association with sickle cell disease phenotypes. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(4):275-276. doi:10.1016/j.bjhh.2015.02.009
27. Galarneau G, Coady S, Garrett ME, et al. Gene-centric association study of acute chest syndrome and painful crisis in sickle cell disease patients. *Blood*. 2013;122(3):434-443. doi:10.1182/blood-2013-01-478776.G.L.
28. Webb J, Kwiatkowski JL. Stroke in patients with sickle cell disease. *Expert Rev Hematol*. 2013;6(3):301-316. doi:10.1586/ehm.13.25
29. Lovett PB, Sule HP, Lopez BL. Sickle cell disease in the emergency department. *Emerg Med Clin North Am*. 2014;32(3):629-647. doi:10.1016/j.emc.2014.04.011
30. Ballas SK. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;68(2-3):105-128. doi:10.3233/CH-189002
31. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, et al. Sickle cell leg ulcers : associations with haemolysis and SNPs in Klotho , TEK and genes of the TGF- β / BMP pathway. 2006:570-578. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x

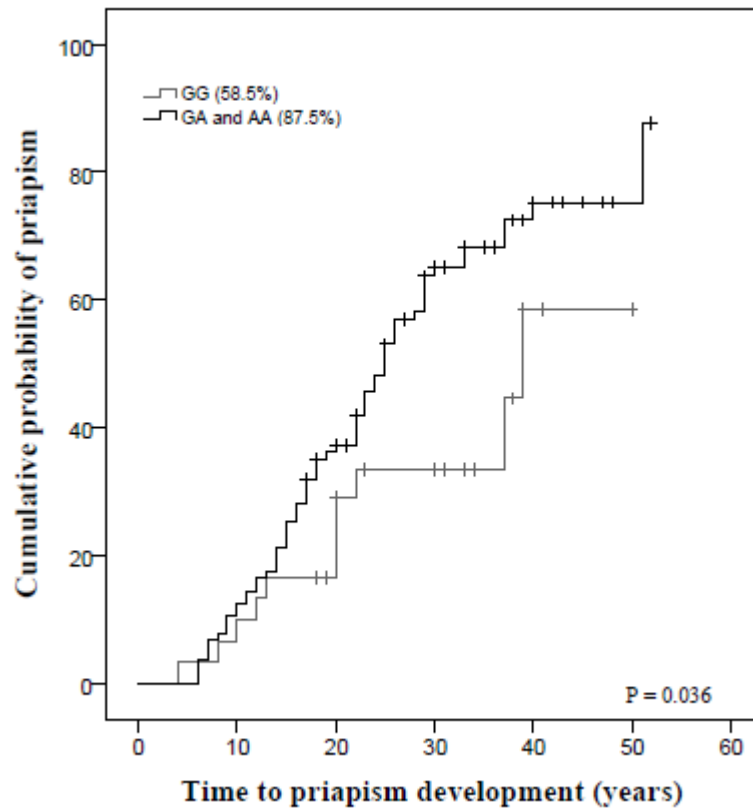


Figure 1: Cumulative incidence of priapism according to genotype of KL rs685417 ($P = 0.036$). Individuals with GG genotype had a lower incidence of priapism (58.5%) when compared to individuals of GA and AA genotypes (87.5%).

Table 1: Association analysis of SCA complications (stroke, osteonecrosis, leg ulcers, and ACS) with clinical, laboratory and genetic variables.

Variables	All patients		Stroke		No stroke		P-value	Osteonecrosis		No osteonecrosis		P-value	Leg ulcers		No leg ulcers		P-value	ACS		No ACS		P-value
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
Gender																	0.002*					
Male	292	49.7	29	36.7	56	37.6	1.0	51	54.3	56	37.6	0.012*	82	56.2	56	37.6		41	48.2	56	37.6	0.130
Female	296	50.3	50	63.3	93	62.4		43	45.7	93	62.4		64	43.8	93	62.4		44	51.8	93	62.4	
Age at diagnosis (years), median																						
At birth	27	4.7	4	5.2	6	4.1	0.888	3	3.3	6	4.1	0.780	4	2.8	6	4.1	0.932	4	4.9	6	4.1	0.038*
Under 2 years of age	55	9.6	4	5.2	9	6.1		6	6.6	9	6.1		10	6.9	9	6.1		14	17.1	9	6.1	
Older than 2 years of age	492	85.7	69	89.6	132	89.8		82	90.1	132	89.8		130	90.3	132	89.8		64	78	132	89.8	
Missing data	14	-	2		2	-		3	-	2	-		2	-	2	-		3	-	2	-	
Fetal hemoglobin (%), median	7.0		4.5		8.2		0.0001*	6.5		8.2		0.004*	5.65		8.2		0.0001*	7.1		8.2		0.188
Range	0.5, 28.5		1.0, 24.4		1, 28			0.8, 17.3		1, 28			0.5, 17.5		1, 28			1.4, 24.4		1, 28		
Hemoglobin (g/dL), median	7.8		7.5		7.9		0.033*	8.1		7.9		0.589	7.6		7.9		0.008*	7.7		7.9		0.220
Range	4.2, 10.5		5.2, 10.2		4.9, 10.4			4.2, 10.3		4.9, 10.4			4.9, 10.2		4.9, 10.4			5.4, 10.5		4.9, 10.4		
White blood cells (x10 ⁹ /L), median	12		12.9		11.5		0.009*	11.1		11.5		0.133	11.6		11.5		0.761	12.2		11.5		0.465
Range	3.3, 33.5		5.2, 33.5		5.1, 29.1			5.2, 26.6		5.1, 29.1			5.2, 30.06		5.1, 29.1			4.5, 30.06		5.1, 29.1		
Platelet count (x10 ⁹ /L), median	415		381.5		415		0.273	397.5		415		0.634	398		415		0.325	416		415		0.462
Range	49, 1,010		115.7, 925		119, 973			143, 925		119, 973			143, 708		119, 973			142, 743		119, 973		
Reticulocyte count (%), median	9.7		10.5		9.3		0.104	9.75		9.3		0.895	9.85		9.3		0.616	9.2		9.3		0.893
Range	2.5, 29.2		2.5, 27.9		2.6, 21.8			2.5, 22		2.6, 21.8			2.5, 24.8		2.6, 21.8			4.1, 27.9		2.6, 21.8		
Lactate dehydrogenase (U/L), median	914		964.5		785		0.056	1024.0		785		0.034*	982		785		0.0001*	855		785		0.458
Range	401, 3,629		411, 3,542		401, 3,153			445, 3,000		401, 3,153			445, 3,000		401, 3,153			445, 3,629		401, 3,153		
Indirect bilirubin (mg/dL), median	2.81		2.7		2.7		0.969	2.99		2.7		0.210	3.1		2.7		0.053	2.8		2.7		0.845
Range	0.6, 36.19		0.98, 9.66		1.11, 9.6			1.38, 14.94		1.11, 9.6			0.98, 36.19		1.11, 9.6			1.36, 11.52		1.11, 9.6		
β ^s haplotype																						
CAR/CAR	336	57.8	51	65.4	83	56.5	0.203	53	56.4	83	56.5	1.0	82	56.6	83	56.5	1.0	45	53.6	83	56.5	0.682
Non-CAR/CAR	245	42.2	27	34.6	64	43.5		41	43.6	64	43.5		63	43.4	64	43.5		39	46.4	64	43.5	
Missing data	7	-	1	-	2	-		0	-	2	-		1	-	2	-		1	-	2	-	
α ^{-3.7kb} -thalassemia																						
Mutated	135	23.2	10	12.8	41	27.7	0.012*	25	26.6	41	27.7	0.883	29	20	41	27.7	0.133	21	25	41	27.7	0.758
Non-mutated	448	76.8	68	87.2	107	72.3		69	73.4	107	72.3		116	80	107	72.3		63	75	107	72.3	
Missing data	5	-	1	-	1	-		0	-	1	-		1	-	1	-		1	-	1	-	
rs211239 (A>G) recessive																						
GG	74	12.6	8	10.1	20	13.4	0.531	16	17	20	13.4	0.463	22	15	20	13.4	0.740	10	11.8	20	13.4	0.840
AG + AA	514	87.4	71	89.9	129	86.6		78	83	129	86.6		124	85	129	86.6		75	88.2	129	86.6	
rs685417 (G>A) dominant																						
GG	101	17.2	9	11.4	35	23.5	0.034*	14	14.9	35	23.5	0.139	24	16.4	35	23.5	0.147	11	13	35	23.5	0.060
GA + AA	487	82.8	70	88.6	114	76.5		80	85.1	114	76.5		122	83.6	114	76.5		74	87	114	76.5	

CAR, Central African Republic, ACS, Acute chest syndrome, * Indicate differences statistically significant.

Table 2: Association analysis of SCA complications (priapism, VOCs per year, and number of complications) with clinical, laboratory and genetic variables.

Variables	All patients		Priapism		No priapism		P-value	0-2 VOCs/per year		3-5 VOCs/per year		>6 VOCs/per year		P-value	0 complication		1 complication		More than 1 complication		P-value
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	
Gender																					
Male	292	49.7	-	-	-	-	-	131	47	113	51	47	54.7	0.405	56	37.6	122	52.4	69	62.7	0.0001*
Female	296	50.3	-	-	-	-		148	53	109	49	39	45.3		93	62.4	111	47.6	41	37.3	
Age at diagnosis (years), median																					
At birth	27	4.7	4	5.4	4	7.4	0.934	9	3.3	13	6	5	6	0.407	6	4.1	11	5	4	3.7	0.592
Under 2 years of age	55	9.6	9	12.2	7	13		28	10.2	17	8	10	12		9	6.1	21	9.3	11	10.2	
Older than 2 years of age	492	85.7	61	82.4	43	79.6		238	86.5	184	86	69	82		132	89.8	192	85.7	93	86.1	
Missing data	14	-	4	-	2	-		4	-	8	-	2	-		2	-	9	-	2	-	
Fetal hemoglobin (%), median	7.0		6.6		7.5		0.213	7.5		7.0		5.7		0.008*	8.2		6.65		5.45		0.0001*
Range	0.5, 28.5		0.8, 24.2		1.9, 23.5			0.7, 28.5		0.9, 25.1		0.5, 26.0			1, 28		0.5, 24.4		0.8, 17.5		
Hemoglobin (g/dL), median	7.8		7.8		7.7		0.464	7.7		7.8		8.1		0.05*	7.9		7.8		7.8		0.143
Range	4.2, 10.5		4.9, 10.3		6, 10.3			5.1, 10.5		4.2, 10.3		4.9, 10.4			4.9, 10.4		4.2, 10.5		4.9, 10.2		
White blood cells (x10⁹/L), median	12		12.575		11.9		0.430	11.5		12.235		12.5		0.196	11.5		12.1		11.6		0.189
Range	3.3, 33.5		5.6, 33.5		7, 29.1			4.5, 33.5		3.3, 32.0		5.6, 30.06			5.1, 29.1		4.5, 32.0		5.2, 33.5		
Platelet count (x10⁹/L), median	415		439		413		0.274	426.5		414		398.5		0.524	415		411		399		0.462
Range	49, 1,010		177, 700		151, 973			161, 1,010		49, 973		115.7, 802			119, 973		115.7, 814		143, 925		
Reticulocyte count (%), median	9.7		10		9.45		0.275	9.6		9.9		9.6		0.582	9.3		9.8		10		0.753
Range	2.5, 29.2		3.2, 28		2.8, 21.8			2.5, 28		2.6, 29.2		3.5, 22			2.6, 21.8		2.5, 28		2.5, 27.9		
Lactate dehydrogenase (U/L), median	914		1012		827		0.087	936		894		899		0.569	785		892		1022, 5		0.005*
Range	401, 3,629		482, 3,692		411, 3,153			401, 3,542		420, 3,692		411, 3,000			401, 3,153		411, 3,542		445, 3,692		
Indirect bilirubin (mg/dL), median	2.81		2.78		2.7		0.525	2.8		2.8		3.21		0.512	2.7		2.8		3.0		0.497
Range	0.6, 36.19		0.6, 9.35		1.36, 7.44			0.98, 36.19		0.6, 12.12		1.2, 12.78			1.11, 9.6		0.6, 36.19		0.98, 14.94		
β^s haplotype																					
CAR/CAR	336	57.8	46	59	31	55.4	0.725	161	58.8	131	59.3	43	50.6	0.348	83	56.5	132	57.4	62	56.4	0.977
Non-CAR/CAR	245	42.2	32	41	25	44.6		113	41.2	90	40.7	42	49.4		64	43.5	98	42.6	48	43.6	
Missing data	7	-	0	-	0	-		5	-	1	-	1	-		2	-	3	-	0	-	
α^{-3.7kb}-thalassemia																					
Mutated	135	23.2	13	16.7	19	34	0.025*	61	22.2	52	23.4	22	25.9	0.775	41	27.7	50	21.7	21	19.1	0.222
Non-mutated	448	76.8	65	83.3	37	66		214	77.8	170	76.6	63	74.1		107	72.3	180	78.3	89	80.9	
Missing data	5	-	0	-	0	-		4	-	0	-	1	-		1	-	3	-	0	-	
rs211239 (A>G) recessive																					
GG	74	12.6	12	15.4	5	8.9	0.305	22	7.9	42	18.9	10	11.6	0.001*	20	13.4	23	9.9	20	18.2	0.096
AG + AA	514	87.4	66	84.6	51	91.1		257	92.1	180	81.1	76	88.4		129	86.6	210	90.1	90	81.8	
rs685417 (G>A) dominant																					
GG	101	17.2	11	14.1	19	33.9	0.011*	41	14.7	38	17.1	22	25.6	0.065	35	23.5	29	12.4	19	17.3	0.019*
GA + AA	487	82.8	67	85.9	37	66.1		238	85.3	184	82.9	64	74.4		114	76.5	204	87.6	91	82.7	

CAR, Central African Republic, VOCs, Vaso-occlusive crisis, * Indicate differences statistically significant.

Table 3: Linear regression to predict VOC in patients with SCA.

Variables	P-value	95% C.I.for EXP(B)	
		Lower	Upper
KL rs211239	,033	-,036	-,001
Fetal hemoglobin (%)	,000	-,036	-,013
Hemoglobin (g/dL)	,000	,046	,015

Table 4: Binary logistic regression to predict priapism in patients with SCA.

Variables	P-value	OR	95% C.I.for EXP(B)	
			Lower	Upper
KL rs685417	,007	3,311	1,395	7,857
α -thalassemia ($\alpha^{-3.7kb}$)	,019	,365	,158	,845

Table 5: Binary logistic regression to predict stroke in patients with SCA.

Variables	P-value	OR	95% C.I.for EXP(B)	
			Lower	Upper
KL rs685417	,029	2,883	1,114	7,463
α -thalassemia ($\alpha^{-3.7kb}$)	,021	,372	,161	,861
Fetal hemoglobin (%)	,000	,856	,788	,928
Hemoglobin (g/dL)	,909	1,018	,752	1,377
WBC count ($\times 10^9/L$)	,026	1,0	1,0	1,0

5 INCREASED SERUM LEVELS OF SOLUBLE KLOTHO IN BRAZILIAN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA WITH OSTEONECROSIS

Artigo a ser submetido para a revista *Annals of hematology* – Fator de impacto: 3,673; Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: B1

Jessica V G F Batista¹, Gabriela S Arcanjo¹, Igor F Domingos², Pablo R G Cardoso³, Ana C dos Anjos⁴, Manuela F Hazin⁴, Maira G R Pitta³, Fernando F Costa⁵, Aderson S Araujo⁴, Antonio R Lucena-Araujo¹, Marcos A C Bezerra^{1*}

Affiliations:

¹Genetics Postgraduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

²Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil;

³Laboratory of Immunomodulation and Novel Therapeutic Approaches (LINAT), Research Center for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴Department of Internal Medicine, Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁵Hematology and Hemotherapy Center, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

*** Corresponding author:** Marcos André Cavalcanti Bezerra. Bioscience Center, Genetics postgraduate program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife, PE, 50610-901, Brazil.

Email: macbezerraufpe@gmail.com

Increased serum levels of soluble klotho in Brazilian patients with sickle cell anemia with osteonecrosis

Abstract

Introduction: *KLOTHO* (*KL*) gene and its encoded proteins are implicated in important biological pathways, which affect sickle cell anemia (SCA) pathophysiology, such as expression of adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1, oxidative stress, bone metabolism and nitric oxide biology. Therefore, it becomes an important candidate as SCA modulator. Objectives: We aimed to evaluate the association of polymorphisms KL rs1207568 (G-395A) and rs9536314 (KL-VS) with SCA clinical complications (stroke, priapism, leg ulcers, osteonecrosis, acute chest syndrome and pain crises). The dosage of soluble klotho in SCA individuals with and without osteonecrosis, and leg ulcers were also evaluated. Methods: 689 individuals were genotyped by real-time PCR using the TaqMan® SNP Genotyping Assays. Of them, 46 had the soluble KL (sKL) dosage performed by the ELISA methodology. Results: No associations between the clinical complications analyzed and the studied polymorphisms ($P > 0.05$) were found. Moreover, individuals with osteonecrosis expressed more sKL than controls and individuals with the GG genotype of the rs1207568 polymorphism also expressed more sKL ($P < 0.05$). Conclusion: KL is an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, essential to bone metabolism. This could explain the association found here with osteonecrosis. Moreover, the higher levels of sKL in GG genotype for the rs1207568 polymorphism corroborate the hypothesis of the influence of this polymorphism on KL gene expression. Finally, these results support the idea that KL is an important modulator in the pathophysiology of SCA.

Keywords: Sickle cell anemia; KL-VS; G-395A; prognostic markers.

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is marked by extreme phenotypic heterogeneity among individuals. In addition to environmental and socioeconomic factors, molecular modulators might also impact the prognosis of the disease [1, 2].

Among the modulators studied, there is *KLOTHO* (*KL*), a gene involved in essential pathways in the pathophysiology of SCA, such as in the biology of nitric oxide, control of oxidative stress, expression of adhesion molecules and bone

metabolism [3–6]. Therefore, previous association studies investigated the influence of different polymorphisms in *KL* with different clinical complications of SCA [7–13].

For example, *KL* rs211239 (A > G) was associated with the number of vaso-occlusive crises, osteonecrosis and priapism. *KL* rs685417 (G > A) was associated with stroke, priapism, osteonecrosis and leg ulcers. *KL* rs2249358 (C > T) has also been associated with priapism and some others SNPs were described in the studies of Baldwin et al and Nolan et al [7, 8, 10, 14]. However, none of the previously published studies evaluated the association of SCA complications with the *KL* SNPs rs1207568 (G-395A) and *KL* rs9536314 (KL-VS).

KL-VS variant comprises six SNPs in perfect linkage disequilibrium, two of which result in amino acid substitutions F352V and C370S altering in vitro secretion and activity of the protein [15, 16]. The single variant F352V, which is used to tag the KL-VS haplotype, implies the substitution of phenylalanine to valine at position 352 [16]. G-395A (rs1207568) is located in the *KL* promoter region; GA+AA refers to the mutant genotypes, whereas GG refers to the wild-type [17]. Considering G-395A location in the regulatory region, this polymorphism is the subject of several studies, but none of them with SCA [18–21].

There are also no studies in the literature that assess the soluble protein klotho (sKL) expression in different complications of SCA.

Therefore, we aim to analyze the association of different complications of SCA with the polymorphisms *KL* rs1207568 and *KL* rs9536314 and also with the expression of sKL in patients with SCA.

Methods

Individuals included in the study

Between January 2002 to March 2020, 689 hemoglobin SS-genotyped patients (diagnosed by HPLC and hemoglobin electrophoresis) were enrolled and regularly followed in a single reference center in Recife, Brazil. Clinical and laboratory information were retrospectively obtained from medical records. For those who received hydroxyurea (HU) therapy (388/689 of enrolled patients, 56%), data were obtained at the time last seen treatment-free. This study was approved by the Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (CAAE: 95188618.0.3001.5195), and, in accordance with the

Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all patients, or their parents or legal guardian.

Patients were divided into subgroups based on their clinical complications: leg ulcers (LUs - ulceration of the skin of the lower legs, especially the medial or lateral surfaces, which failed to heal within two weeks); osteonecrosis (ON - patients who had X-ray radiography and/or magnetic resonance imaging documented necrosis of the hip or shoulder); stroke (patients who had neurological injury diagnosed by imaging and apparent complaints); acute chest syndrome (ACS - patients who had a pulmonary infiltrate on the chest X-ray); and priapism (male patients who had at least one episode of a painful erection of the penis that lasted more than one hour and required medical care). We also categorized patients by the frequency of vaso-occlusive crises (VOCs) requiring hospitalization per year and the number of complications. The frequency of these complications was determined by clinical reports from the medical records and imaging tests when applicable.

Overall, the control group was composed of patients with SCA, over 18-years-old, without the five principal complications mentioned above. Due to the high prevalence of VOCs in cohort, the patients were grouped according to the number of events (0 – 2 VOCs / per year, 3 – 5 VOCs / per year, > 6 VOCs / per year) for the analyses.

SNP genotyping

Peripheral blood samples were collected from all patients, and genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method. *KL* polymorphisms (rs1207568, #C__7604792_10; rs9536314, #C__2983037_20) were genotyped using TaqMan® SNP Genotyping Assays following manufacturer's instructions.

Soluble Klotho Measurement

Serum was separated from the peripheral blood and stored until use at -80°C. sKL levels were determined in duplicate using an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Catalog: EH4278; Finetest, Wuhan, China). For the measurement, individuals without blood transfusions in the last three months, older than 18 years old and in its basal state were included. Individuals with ON, individuals with LUs and control individuals (HbSS individuals without the 5 main

complications) were analyzed. In addition, individuals with and without HU therapy were also compared. Dosages were also analyzed comparing individuals with active LUs and individuals with healed LUs. The sKL levels between the different genotypes of the KL rs1207568 and KL rs9536314 polymorphisms were also compared.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the software SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation) and GraphPad Prism (version 5.0). Fisher's exact test or chi-square test, as appropriate, was used to compare categorical variables. Continuous variables were expressed as median and were compared by Mann Whitney or Kruskal-Wallis tests. All P values were two-sided with a significance level of 0.05.

Results

Individuals characteristics

Individuals included had a median age of 29 years (range 3 to 70 years), with 339 males (49.2%). Overall, 93 (13.5%) patients developed stroke; 97 (14.1%) had ON; 146 (21.2%) had LUs; 97 of the men (28.6%) presented priapism; and 111 patients (16.1%) had ACS. One hundred seventy-one of them (24.8%) were assigned to the control group (for priapism, 59). Regarding VOCs, 327 patients had less than 3 episodes; 254, between 3 and 6; and 106, more than 6 (two patients did not have this information on the medical records). All main clinical and laboratory features are summarized in Tables 1 and 2.

SNP Genotyping

The distribution of genotypes for *KL* polymorphisms was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). For *KL* rs9536314, the genotypic frequency was TT (520/75.5%), TG (160/23.2%), and GG (9/1.3%), with minor allele frequency (MAF) of 12.9%. For *KL* 1207568, GG (500/72.6%), GA (172/25%), and AA (17/2.5%), the MAF was 14.9%. We analyzed the dominant, co-dominant, recessive, and over-dominant association models for both polymorphisms, but no associations were found with any of the clinical complications studied ($P > 0.05$). Tables 1 and 2 show the results found when analyzing the dominant model.

Soluble Klotho Measurement

We included 46 patients with SCA for sKL quantification (22 male, 47.8%), median levels 599.45 pg/ml (166.72 pg/ml – 4303.09 pg/ml). Of them, eleven individuals had ON, 17 had LUs, and 17 were controls without any complications; 18 were undergoing therapy with HU and 28 were not using the medication. According to the studied polymorphisms, for rs1207568, 32 individuals had GG genotype, 12, GA, and 2, AA; for rs9536314, 36 had TT genotype, and 10, TG genotype, there were no individuals with GG genotype for dosage analyses.

Individuals with ON (median 1255.8 pg/ml) had higher levels of sKL when compared to control group (median 443.09 pg/ml) ($P = 0.007$) (Figure 1). It was also observed that SCA individuals with GG genotype for KL rs1207568 had higher sKL concentrations (median 725.8 pg/ml) than those with GA and AA genotypes (median 401.2 pg/ml) ($P = 0.025$) (Figure 2a). This association was also observed when the individuals with ON were excluded ($P = 0.013$) (Figure 2b). No statistically significant differences were found between genders, individuals with and without the use of HU (Figure 3), individuals with and without LUs (Figure 4), and also between individuals with different KL rs9536314 genotypes (Figure 5) ($P > 0.05$).

Discussion

Klotho arouses interest in studies that assess molecular modulation in SCA as it is related to the biology of nitric oxide, expression of adhesion molecules, prevention of oxidative stress and regulation of bone metabolism, being an attractive target for study [8, 19–21]. However, no published studies have evaluated the association of SCA complications with the functional polymorphisms G395-A (rs1207568) and KL-VS (rs9536314) neither with sKL serum levels.

Here we aimed to evaluate the genetic contribution of these *KL* variants with the frequency of different SCA complications (stroke, LUs, ON, ACS, priapism and VOCs) and the influence of these polymorphisms on expression levels of sKL on these patients. In addition, we also aimed to evaluate the dosage of sKL in ON and LUs compared with the control group.

Although rs1207568 and rs9536314 have been associated with different phenotypes in other diseases [25–28], our study did not show an association with the clinical complications studied in individuals with SCA.

Some studies analyzed clinical complications common in SCA, such as ON and stroke, in another clinical context. Both polymorphisms were studied by Yeter et al. to assess whether there was an association with the frequency of ON in individuals after kidney transplantation. However, similar to our findings, they found no association with this complication [29]. Individuals heterozygous for KL-VS showed a lower risk for developing stroke in other studies. One of them studied individuals from India with and without a history of ischemic stroke, and the other evaluated individuals over 50 years old and found that the heterozygous genotype protects against stroke [30, 31]. We did not reproduce this association in our cohort of SCA individuals, but the genetic background of the populations, the different study designs and the underlying diseases involved must be considered.

Although we have not found an association, it is interesting that studies with more significant sample numbers and in other populations with SCA are also developed with G-395A and KL-VS to assess the presence or absence of association in other populations.

Here, we found higher levels of sKL in individuals with ON than in controls. Moreover, SCA individuals with the GG genotype for the *KL* rs1207568 polymorphism expressed higher levels of sKL than SCA individuals with the GA and AA genotypes.

Initially, we expected to find lower sKL levels in individuals with ON since KL stimulates the inhibition of adhesion molecules and promotes nitric oxide expression [3, 23, 24], both important in SCA pathophysiology. In addition, *KL* knockout mice exhibited osteoporosis phenotype [32], and some studies have associated lower sKL levels with lower bone mineral density and osteoporosis [33–35], being justified by the role of KL, together with FGF-23 in the homeostasis of mineral metabolism. However, our results can be explained by the antagonism of sKL in the Wnt/ β -catenin pathway [6].

The Wnt/ β -catenin is an intracellular signalling pathway that plays a crucial role in bone formation, regulating osteoblast activity. When this pathway is inhibited, bone formation is also inhibited. Conversely, when activated, β -catenin is stabilized in the cytoplasm and translocated to the nucleus to activate the transcription of bone-forming genes [36, 37]. This pathway has activators and inhibitors. sKL acts as an antagonist by binding to extracellular pathway activators Wnt3/5 proteins [38, 39].

Some reports associated the inhibition of this pathway with ON in different groups. Wu et al. (2019) described that individuals with ON associated with the use of glucocorticoids had FZD1, an activator of the Wnt/ β -catenin pathway, hypermethylation. This hypermethylation would inhibit the pathway and consequently impact bone formation, leading to ON in those individuals [40]. Ferreira et al. (2021) identified that rats with ON had reduced immunoexpression of Wnt and β -catenin, suggesting an association between this reduction and ON [41]. Chen et al. (2021) found that individuals with alcohol-induced ON had higher expression of DKK-1, a critical inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, supporting the idea that high levels of inhibitors of this pathway compromise bone homeostasis [42]. Another study that corroborates our hypothesis was developed by Komaba et al. (2017), who analyzed *KL* osteocytes-knockout mice and perceived more significant bone formation in these animals than in non-mutated ones, suggesting the explanation via inhibition of Wnt/ β -catenin exerted by *KL* [43].

Osteonecrosis in SCA individuals has a complex pathophysiology, occurring partly due to micro-occlusions in the bone microvasculature that lead to tissue infarctions and consequent necrosis, as the lesions overlap with regeneration [44, 45]. Thus, the sKL higher levels found in SCA patients with ON may interfere with the Wnt/ β -catenin pathway and contribute to the emergence of the complication in these patients.

This result leads us to believe that *KL*, despite being involved in the expression of molecules and enzymes important to SCA pathophysiology (such as nitric oxide, antioxidant enzymes and reducing the expression of adhesion molecules), due to its inhibitory action on the pathway Wnt/ β -catenin could be a risk factor for the development of ON. Further studies with a larger cohort and functional analysis investigating the Wnt/ β -catenin pathway and mineral metabolism are important to unravel the mechanisms in which *KL* is involved.

Lastly, we found sKL higher levels in *KL* rs1207568 GG patients when compared with *KL* rs1207568 GA and AA genotypes. Our results agree with the findings of Donate-Correa et al (2016), who found lower expression of *KL* mRNA in vascular tissue of individuals with GA and AA genotypes [46]. Kawano et al. (2002) speculated that the presence of the A allele would decrease expression. Unlike our findings, Helvaci et al. (2020) did not find an association between *KL* expression and

this polymorphism when analyzed individuals with and without acromegaly [18]. The discrepancies observed in these studies might be due to the possible existence of other important regulatory elements for the expression and/or function of Klotho. Therefore, more studies must be developed to analyze this association, considering that few reports in the literature assess the association of this polymorphism with the expression of the sKL protein.

In conclusion, *KL* polymorphisms rs9536314 and rs1207568 were not associated with complications in SCA. However, higher expression of sKL might be a risk factor for ON. This result corroborates the idea that *KL* can be an important modulator of SCA, and it is important that more and more studies are developed seeking to assess how it can impact the clinic of these individuals. We also found that individuals with *KL* rs1207568 GG genotype express more sKL levels than *KL* rs1207568 GA and AA individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The authors thank to the sickle cell anemia patients and their families who made this research possible.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.V.G.F.B. conceived and designed the study, performed experiments, analyzed and interpreted data, performed the statistical analyses, and drafted the article. G.S.A., I.F.D. P.R.G.C. collected data, and reviewed the paper. A.C.A., A.S.A., F.C.F, M.F.H. recruited patients, updated clinical data and reviewed the manuscript. M.G.R.P, A.R.L.A. and M.A.B. gave final approval of the submitted version.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of interest

The authors have no relevant competing interest to declare.

Ethical approval and informed consent

The local research ethics board approved this study (CAAE: 95188618.0.3001.5195) and, in accordance with the Declaration of Helsinki, informed consent was obtained from all participants before study commencement. For those under the age of 18 years, informed consent was obtained from their parents or legal guardian.

References

1. Habara A, Steinberg MH (2016) Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med* 241:689–696. <https://doi.org/10.1177/1535370216636726>
2. Huttie A, Maestre G, Lantigua R, Green NS (2015) Sickle Cell in Sickle Cell Disease in Latin America and the United States. *Pediatr Blood Cancer* 62:1131–1136. <https://doi.org/10.1002/pbc>
3. Richter B, Haller J, Haffner D, Leifheit-nestler M (2016) Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Eur J Physiol* 468:1621–1635. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1858-x>
4. Liu L, Gao H, Hong C, et al (2017) Klotho attenuated antibody-mediated porcine endothelial cell activation and injury. *Xenotransplantation* 24:1–7. <https://doi.org/10.1111/xen.12286>
5. Hum JM, O'Bryan L, Smith RC, White KE (2017) Novel functions of circulating Klotho. *Bone* 100:36–40. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.11.025>
6. Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Fernández-Villabrille S, et al (2021) Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/ β -Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders. *Calcif Tissue Int* 108:439–451. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00803-2>
7. Nolan VG, Baldwin C, Ma Q, et al (2004) Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 128:266–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05295.x>
8. Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, et al (2005) Association of klotho , bone morphogenic protein 6 , and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. *Blood* 106:372–376. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0548>.Supported
9. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, et al (2006) Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho , TEK and genes of the TGF- β / BMP pathway. *Br J Haematol* 570–578. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x>

10. Batista JVGF, Pereira-Martins DA, Falcão DA, et al (2021) Association of KLOTHO polymorphisms with clinical complications of sickle cell anemia. *Ann Hematol*. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04532-w>
11. Pacheco APA de S, Gonçalves M (2014) Klotho : its various functions and association with sickle cell disease subphenotypes. *Rev Bras Hematol Hemoter* 36:430–436
12. Elliott L, Ashley-koch AE, Castro L De, et al (2007) Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *Br J Haematol* 137:262–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06560.x>
13. Ulug P, Vasavda N, Awogbade M, et al (2009) Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. *Ann Hematol* 88:803–805. <https://doi.org/10.1007/s00277-008-0659-5>
14. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, et al (2006) Sickle Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. *Br J Haematol* 133:570–578
15. Freathy RM, Weedon MN, Melzer D, et al (2006) The functional “KL-VS” variant of KLOTHO is not associated with type 2 diabetes in 5028 UK Caucasians. *BMC Med Genet* 7:1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-7-51>
16. Arking DE, Krebsova A, Macek M, et al (2002) Association of human aging with a functional variant of klotho. *PNAS* 99:856–861
17. Kawano K, Ogata N, Chiano M, et al (2002) Klotho Gene Polymorphisms Associated With Bone Density of Aged Postmenopausal Women. *J bone Miner Res* 17:1744–1751
18. Helvaci N, Kabacam S, Dagdelen S, et al (2020) Klotho gene G395A and C1818T polymorphisms in acromegaly: Association with clinical presentation and comorbidities. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1–8. <https://doi.org/10.1111/cen.14380>
19. Abulizi P, Zhou XH, Keyimu K, et al (2017) Correlation between KLOTHO gene and mild cognitive impairment in the Uygur and Han populations of Xinjiang. *Oncotarget* 8:75174–75185. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20655>

20. Zhang F, Zhai G, Kato BS, et al (2007) Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population. *Osteoarthr Cartil* 15:624–629. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.12.002>
21. Luo L, Hao Q, Dong B, Yang M (2016) The Klotho gene G-395A polymorphism and metabolic syndrome in very elderly people *Biology and technology. BMC Geriatr* 16:1–7. <https://doi.org/10.1186/s12877-016-0221-6>
22. Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, et al (2005) Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho. *J Biol Chem* 280:38029–38034
23. Chung CP, Chang YC, Ding Y, et al (2017) α -Klotho expression determines nitric oxide synthesis in response to FGF-23 in human aortic endothelial cells. *PLoS One* 12:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176817>
24. Maekawa Y, Ishikawa K, Yasuda O, et al (2009) Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. *Endocr* 35:341–346. <https://doi.org/10.1007/s12020-009-9181-3>
25. Ali A, Tursun H, Talat A, et al (2017) Association study of Klotho gene polymorphism with calcium oxalate stones in the Uyghur population of Xinjiang, China. *Urol J* 14:2939–2943. <https://doi.org/10.22037/uj.v14i1.3636>
26. Kim Y, Kim JH, Nam YJ, et al (2006) Klotho is a genetic risk factor for ischemic stroke caused by cardioembolism in Korean females. *Neurosci Lett* 407:189–194. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.039>
27. Revelas M, Thalamuthu A, Oldmeadow C, et al (2018) Review and meta-analysis of genetic polymorphisms associated with exceptional human longevity. *Mech Ageing Dev* 175:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.06.002>
28. Tangri N, Alam A, Wooten EC, Huggins GS (2011) Lack of association of Klotho gene variants with valvular and vascular calcification in Caucasians: A candidate gene study of the Framingham Offspring Cohort. *Nephrol Dial Transplant* 26:3998–4002. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr188>
29. Yeter HH, Helvacı O, Korucu B, et al (2020) Factors Affecting Bone Health in Kidney Transplant Recipients: Klotho Gene Single-Nucleotide Polymorphisms and Other Clinical Features. *Exp Clin Transplant* 1–10. <https://doi.org/10.6002/ect.2020.0130>

30. Arking DE, Atzmon G, Arking A, et al (2005) Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res* 96:412–418. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000157171.04054.30>
31. Majumdar V, Nagaraja D, Christopher R (2010) Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 403:412–416. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.045>
32. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45–51
33. Zheng S, Chen Y, Zheng Y, et al (2018) Correlation of serum levels of fibroblast growth factor 23 and Klotho protein levels with bone mineral density in maintenance hemodialysis patients. *Eur J Med Res* 23:1–7. <https://doi.org/10.1186/s40001-018-0315-z>
34. Baldan A, Giusti A, Bosi C, et al (2015) Klotho, a new marker for osteoporosis and muscle strength in β -thalassemia major. *Blood Cells, Mol Dis* 55:396–401. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.08.004>
35. Han W, Bai XJ, Han LL, et al (2019) The relationship between serum fibroblast growth factor 23, Klotho, and lumbar spine bone mineral density in northern Chinese postmenopausal women. *Menopause* 26:546–553. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001276>
36. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM (2004) Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341:19–39. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.044>
37. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* 17:9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
38. Ming Chang Hu, Makoto Kuro-o, Moe OW, Kuro-o M (2012) Endocrine Fgfs and Klothos. Chapter 9: Secreted Klotho and Chronic Kidney Disease. 126–157
39. Ma L, Gao M, Wu L, et al (2018) The suppressive effect of soluble Klotho on Fibroblastic Growth Factor 23 synthesis in UMR-106 osteoblast-like cells. *Cell Biol Int* 47:367–371. <https://doi.org/10.1002/cbin.10997>

40. Wu F, Jiao J, Liu F, et al (2019) Hypermethylation of Frizzled1 is associated with Wnt/ β -catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis. *Exp Mol Med* 51:. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0220-8>
41. de Sousa Ferreira VC, Lopes AP, Alves NM, et al (2021) Bisphosphonate-related osteonecrosis induced change in alveolar bone architecture in rats with participation of Wnt signaling. *Clin Oral Investig* 25:673–682. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03551-7>
42. Chen J, Yang C, Yang Y, et al (2021) Targeting DKK1 prevents development of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head in rats. *Am J Transl Res* 13:2320–2330
43. Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, et al (2017) Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int* 92:599–611. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.014>
44. Adesina OO, Neumayr LD (2019) Osteonecrosis in sickle cell disease: An update on risk factors, diagnosis, and management. *Hematology* 351–358. <https://doi.org/10.1182/hematology.2019000038>
45. Almeida A, Roberts I (2005) Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol* 129:482–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05476.x>
46. Donate-correa J, Martin-Nunez E, Martinez-Sanz R, et al (2016) Influence of Klotho gene polymorphisms on vascular gene expression and its relationship to cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 20:128–133. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12710>

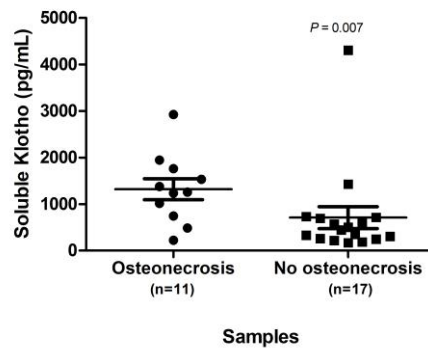


Figure 1 Serum sKL levels in SCA individuals with and without osteonecrosis (ON). Individuals with osteonecrosis had higher sKL levels than the control group ($P = 0.007$).

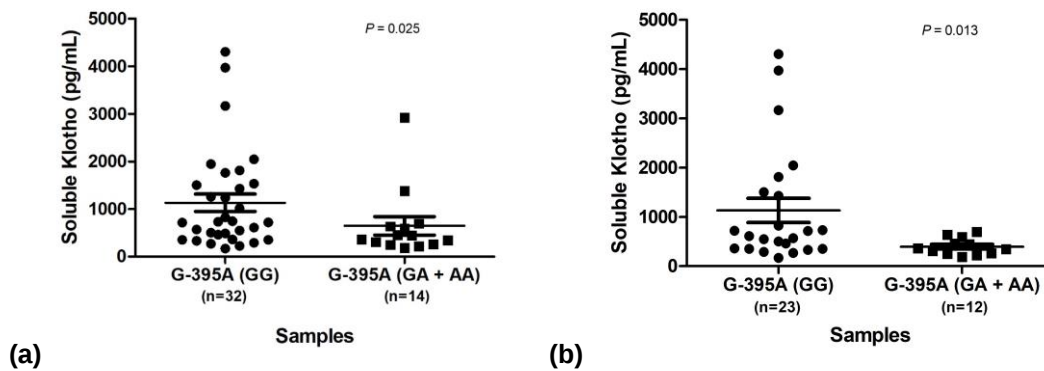


Figure 2 (a) Serum sKL levels in SCA individuals with rs1207568 GG and GA+AA genotypes. Individuals with GG genotype had higher sKL levels than those with GA and AA individuals ($P = 0.025$). (b) The association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.013$).

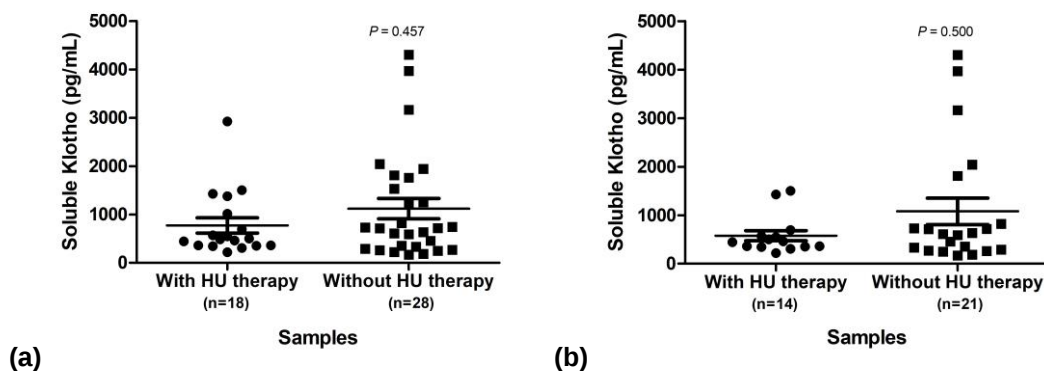


Figure 3 (a) Serum sKL levels in SCA individuals with and without HU therapy do not show statistically significant difference ($P = 0.457$). (b) The lack of association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.500$).

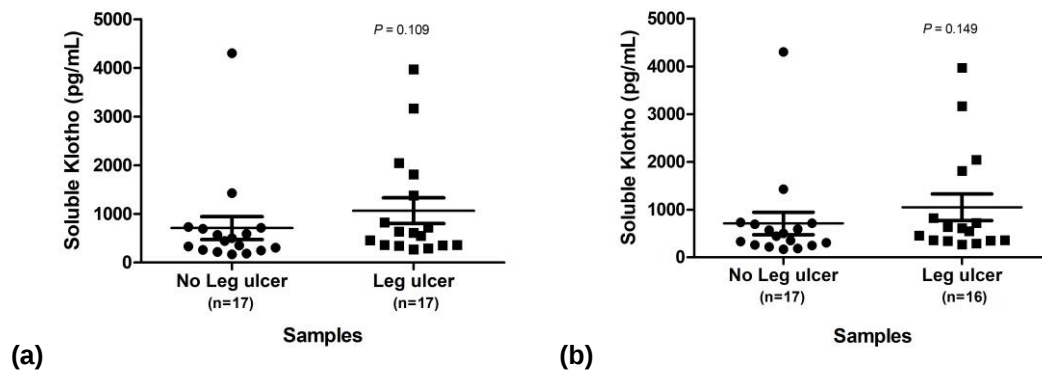


Figure 4 (a) Serum sKL levels in SCA individuals with and without LUs do not show statistically significant difference ($P = 0.109$). (b) The lack of association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.149$).

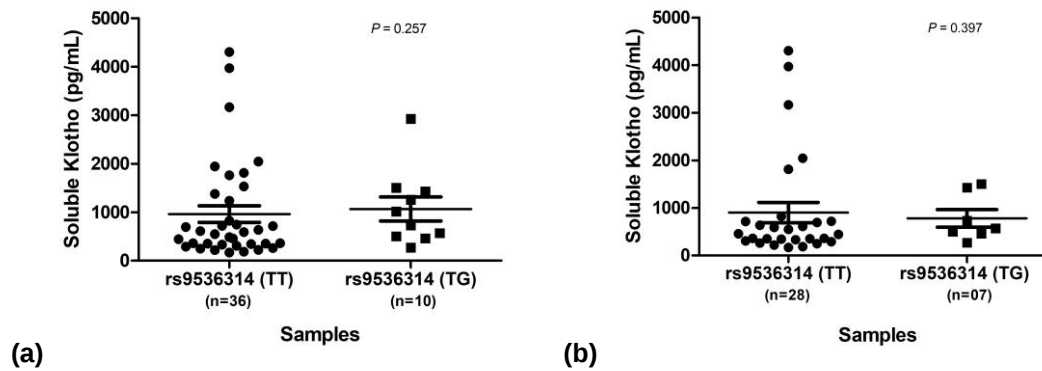


Figure 5 (a) Serum sKL levels in SCA individuals with genotypes TT and TG for KL rs9536314 do not show statistically significant difference ($P = 0.257$). (b) The lack of association is maintained when individuals with ON are removed ($P = 0.397$).

Table 1: Association analysis of SCA complications with clinical, laboratory and genetic variables.

Variables	All patients		Stroke		No stroke		P-value	Osteonecrosis		No osteonecrosis		P-value	Leg ulcers		No leg ulcers		P-value	ACS		No ACS		P-value
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%		N	%	N	%	
Gender							0.505					0.003*					<0.001*					0.034*
Male	339	49.2	36	39	59	34.5		45	46.4	59	34.5		66	45	59	34.5		58	52	59	34.5	
Female	350	50.8	57	61	112	65.5		52	53.6	112	65.5		80	55	112	65.5		53	48	112	65.5	
Fetal hemoglobin (%), median	7.2		4.5		8.6		<0.001*	6.3		8.6		0.001*	5.6		8.6		<0.001*	7.1		8.6		0.075
Range	0.5 – 28.5		1.0 – 15.8		1.5 – 28			0.8 – 17.3		1.5 – 28			0.5 – 17.5		1.5 – 28			1.5 – 28		1.5 – 28		
Hemoglobin (g/dL), median	7.8		7.5		7.9			7.95		7.9			0.669	7.7		7.9			0.033*	7.65		
Range	4.2 – 10.5		5.2 – 10.2		4.9 – 10.4		4.2 – 10.3		4.9 – 10.4			4.9 – 10.2		4.9 – 10.4			5.4 – 10.5		4.9 – 10.4			
White blood cells (x10 ⁹ /L), median	12.2		13.7		11.5		0.014*	11.1		11.5		0.101	11.6		11.5		0.635	12.5		11.5		0.314
Range	2.7 – 37.9		5.2 – 37.9		2.7 – 34.1			5.2 – 26.6		2.7 – 34.1				5.2 – 30.0		2.7 – 34.1				4.5 – 35.2		
Platelet count (x10 ⁹ /L), median	415.5		381.5		415		0.259			415		0.464			415		0.331			415		0.520
Range	49 – 1,790		115.7 – 925		151 – 1,790			143 – 925		151 – 1,790				143 – 708		151 – 1,790				142 – 743		
Reticulocyte count (%), median	9.8		10.2		9.3		0.151	9.8		9.3		0.862	9.8		9.3		0.635	9.2		9.3		0.962
Range	2.5 – 29.2		2.5 – 27.9		2.6 – 21.8			2.5 – 22		2.6 – 21.8				2.5 – 26.7		2.6 – 21.8				4.1 – 27.9		
Lactate dehydrogenase (U/L), median	915		964.5		804		0.077	1043		804		0.022*	982		804		<0.001*	855		804		0.647
Range	401 – 3692		427 – 3542		401 - 3153			445 – 3000		401 - 3153				445 - 3000		401 - 3153				445 – 3692		
Indirect bilirubin (mg/dL), median	2.8		2.7		2.7		0.899	2.97		2.7		0.345	3.1		2.7		0.082	2.68		2.7		0.672
Range	0.6 – 36.19		0.98 – 9.6		1.11 – 9.6			1.38 – 14.94		1.11 – 9.6				0.9 – 36.19		1.11 – 9.6				1.36 – 11.5		
β ^S haplotype							0.181					0.897					0.731					0.901
CAR/CAR	378	57.8	58	65	92	56		55	57	92	56		84	58	92	56		61	57	92	56	
Non-CAR/CAR	276	42.2	31	35	73	44		41	43	73	44		61	42	73	44		46	43	73	44	
Missing data	35	-	4	-	6	-		1	-	6	-		1	-	6	-		4	-	6	-	
α ^{-3.7kb} thalassemia							0.071					0.882					0.502					0.886
Mutated	148	23	12	14	41	25		25	26	41	25		31	21	41	25		27	26	41	25	
Non-mutated	496	77	72	86	124	75		70	74	124	75		115	79	124	75		77	74	124	75	
Missing data	45	-	9	-	6	-		2	-	6	-				6	-		7	-	6	-	
rs1207568 (G>A) dominant							0.380					0.216					1.0					0.688
GG	500	72.6	72	77	123	72		62	64	123	72		105	72	123	72		77	69	123	72	
GA+ AA	189	27.4	21	23	48	28		35	36	48	28		41	28	48	28		34	31	48	28	

rs9536314 (T>G)	0.767						0.471						0.278						1.0
dominant																			
TT	520	75.5	68	73	129	75	69	71	129	75	118	81	129	75	84	76	129	75	
TG+GG	169	24.5	25	27	42	25	28	29	42	25	28	19	42	25	27	24	42	25	

CAR, Central African Republic, ACS, Acute chest syndrome, * Indicate differences statistically significant.

Table 2: Association analysis of SCA complications with clinical, laboratory and genetic variables.

Variables	All patients		Priapism		No priapism		P-value	0-2 VOCs/per year		3-5 VOCs/per year		>6 VOCs/per year		P-value	0 complication		1 complication		More than 1 complication		P-value
	N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	
Gender							-							0.422							<0.001*
Male	339	49.2	-	-	-	-		155	47	124	49	58	55		59	34.5	153	53	72	64	
Female	350	50.8	-	-	-	-		172	53	130	51	48	45		112	65.5	136	47	41	36	
Fetal hemoglobin (%), median	7.2		6.6		8.0		0.167	7.7		7.1		5.6		0.001*	8.6		6.6		5.4		<0.001*
Range	0.5 – 28.5		0.8 – 24.2		1.9 – 23.5			0.7 – 28.5		0.9 – 25.1		0.5 – 26			1.5 – 28		0.5 – 24.4		0.8 – 17.5		
Hemoglobin (g/dL), median	7.8		7.8		7.6		0.239	7.7		7.8		8.1		0.088	7.9		7.8		7.7		0.188
Range	4.2 – 10.5		4.9 – 10.3		5.2 – 10.3			5.1 – 10.5		4.2 – 10.3		4.9 – 10.4			4.9 – 10.4		4.2 – 10.5		4.9 – 10.2		
White blood cells (x10⁹/L), median	12.2		12.9		11.7		0.223	11.7		12.2		12.8		0.233	11.5		12.3		11.6		0.128
Range	2.7 – 37.9		5.6 – 33.5		7.5 – 29.1			4.5 – 35.2		2.7 – 34.1		5.6 – 37.9			2.7 – 34.1		4.5 – 37.9		5.2 – 33.5		
Platelet count (x10⁹/L), median	415.5		441.0		414.5		0.146	431.0		411.0		398.0		0.316	415.0		411.0		399.0		0.462
Range	49 – 1,790		177 – 875		151 – 1,790			161 – 1,790		49 – 973		115.7 – 802			119 – 1,790		115.7 – 875		143 – 925		
Reticulocyte count (%), median	9.8		10		9.45		0.407	9.7		9.85		9.85		0.845	9.3		9.9		9.9		0.867
Range	2.5 – 29.2		3 – 28		2.8 – 29.2			2.5 – 32		2.6 – 29.2		3.5 – 22			2.6 – 21.8		2.5 – 28		2.5 – 27.9		
Lactate dehydrogenase (U/L), median	915		1009		1010		0.130	910		962		907		0.668	804		900		1022.5		0.007*
Range	401 – 3692		482 – 3692		411 – 3153			401 – 3542		420 – 3692		411 – 3000			401 – 3153		427 – 3542		445 – 3692		
Indirect bilirubin (mg/dL), median	2.8		2.76		2.7		0.679	2.8		2.73		3.02		0.630	2.7		2.72		2.95		0.567
Range	0.6 – 36.19		0.6 – 9.35		1.36 – 7.44			0.98 – 36.19		0.6 – 12.12		1.2 – 12.78			1.11 – 9.6		0.6 – 36.19		0.98 – 14.94		
β^S haplotype							0.741							0.541							0.867
CAR/CAR	378	57.8	54	56	31	53		180	59	142	58	55	53		92	56	162	58	64	57	
Non-CAR/CAR	276	42.2	42	44	27	47		125	41	102	42	49	47		73	44	116	42	49	43	
Missing data	35	-	1	-	1	-		22	-	10	-	2	-		6	-	11	-	0	-	
α^{3.7kb}-thalassemia							0.015*							0.697							0.490
Mutated	148	23	14	15	19	33		65	21.6	58	24	25	25		41	25	61	23	21	20	
Non-mutated	496	77	79	85	39	67		236	78.4	185	76	74	75		124	75	208	77	91	80	
Missing data	45	-	4	-	1	-		26	-	11	-	7	-		6	-	20	-	1	-	

rs1207568 (G>A) co-dominant							0.702							0.710							0.445	
GG	500	72.6	72	74	46	78	240	73	180	71	79	75	123	72	215	74	77	68				
GA+AA	189	27.4	25	26	13	22	87	27	74	29	27	25	48	28	74	26	36	32				
rs9536314 (T>G) dominant							0.692							0.216							0.922	
TT	520	75.5	77	79	45	76	250	76	196	77	73	71	129	75	217	75	87	77				
TG+GG	169	24.5	20	21	14	24	77	24	58	23	33	29	42	25	72	25	26	23				

CAR, Central African Republic, VOCs, Vaso-occlusive crisis, * Indicate differences statistically significant.

6 DISCUSSÃO GERAL

KLOTHO é um gene importante na produção do NO, na homeostase vascular por inibir expressão de moléculas de adesão e no combate ao estresse oxidativo (MAEKAWA et al., 2009; RICHTER et al., 2016; SHEN et al., 2018). Em virtude disso, torna-se um interessante candidato a modulador molecular da AF, já tendo sido estudado por diversos grupos que avaliaram associação de diferentes polimorfismos com diferentes complicações da doença (BALDWIN et al., 2005; ELLIOTT et al., 2007; NOLAN et al., 2004, 2006a; ULUG et al., 2009).

Neste trabalho, foi descrita pela primeira vez a associação do polimorfismo rs211239 (A > G) com o número de crises vaso-oclusivas e também do polimorfismo rs685417 (G > A) com AVC, priapismo e número de complicações em indivíduos com AF. Esses polimorfismos foram selecionados por terem sido associados na literatura com diferentes complicações da AF. O *KL* rs211239 fora descrito por Baldwin e cols. (2005) associado com osteonecrose e, por Nolan e cols. (2004), com priapismo (BALDWIN et al., 2005; NOLAN et al., 2004). No presente estudo estes resultados não foram reproduzidos, o que pode ser explicado pela diferença populacional entre os estudos (este com população Pernambucana e os outros com população Americana composta por Afrodescendentes) e pelos diferentes critérios na seleção de grupos controle (aqui, foram selecionados indivíduos acima de 18 anos sem nenhuma das 5 principais complicações, enquanto no de Baldwin e cols. foram indivíduos adultos apenas sem osteonecrose e no de Nolan e cols. foram indivíduos a partir de 10 anos apenas sem priapismo, sendo esse fator da idade também um viés importante). Ulug e cols. (2009) ao estudarem indivíduos Afrodescendentes também não encontraram associação com osteonecrose e Elliott e cols. (2007) também não encontraram associação com priapismo (BALDWIN et al., 2005; ELLIOTT et al., 2007; NOLAN et al., 2004; ULUG et al., 2009).

O polimorfismo *KL* rs685417 (G > A) fora associado anteriormente com úlceras de perna e osteonecrose (BALDWIN et al., 2005; NOLAN et al., 2006a). Aqui, essas associações não foram reproduzidas, sendo, assim como para o polimorfismo *KL* rs211239, uma possível explicação a diferença entre composição genética das populações entre os estudos e também os diferentes critérios de seleção de grupos. Por outro lado, mostrou-se, pela primeira vez, associação desse *SNP* com priapismo, AVC e número de complicações.

Essas associações encontradas podem estar associadas a alguma alteração que esses polimorfismos venham a trazer no produto gênico de *KL*, sendo importante que estudos funcionais com eles sejam desenvolvidos.

Além deles, os polimorfismos funcionais *KL* 1207568 (G > A) e *KL* rs9536314 (T > G) também foram estudados, uma vez que apresentam descrição funcional na literatura e são associados com diferentes fenótipos em outras condições clínicas (HAO et al., 2018; KAWANO et al., 2002; REVELAS et al., 2018). Entretanto, não foram encontradas associações entre eles e as complicações clínicas analisadas na AF. Apesar de não terem sido encontradas associações, devido ao fato de terem descrição funcional e ao fato de *KL* ter diversas funções descritas em vias importantes na fisiopatologia da AF, é interessante que mais estudos sejam desenvolvidos para avaliar se em outras populações outros resultados são descritos.

Por fim, ao realizar a dosagem do sKL foi percebido que indivíduos com osteonecrose apresentaram maior dosagem do que aqueles sem a complicação. Uma possível explicação para esse resultado pode ser encontrada na inibição que sKL exerce na via Wnt/ β -catenina. Uma vez inibida esta via, é comprometida a regeneração óssea, o que pode contribuir para o surgimento da osteonecrose, complicação que surge pelos sucessivos micro infartos ósseos comuns na AF, consequente dano tecidual e falha na regeneração (CARRILLO-LÓPEZ et al., 2021; MUÑOZ-CASTAÑEDA et al., 2020). Há outros estudos na literatura que associam a inibição dessa via com o surgimento de osteonecrose em outros contextos clínicos que não da AF. Por exemplo, Wu e cols. encontraram associação de osteonecrose com o uso de glicocorticóides que estariam inibindo o receptor Frizzled1, importante para a ativação da via; outro exemplo é de Chen e cols., que encontraram associação entre o uso de álcool levando ao aumento de DKK-1 (importante inibidor da via) e o desenvolvimento de osteonecrose (CHEN et al., 2021; WU et al., 2019).

Embora neste caso *KL* tenha aparecido como um fator de risco para osteonecrose, não necessariamente seria um fator de risco para outras complicações e para a AF de modo geral, uma vez que suas funções levam a crer que é uma proteína protetora para a fisiopatologia da AF. Essa associação de risco pode estar associada especificamente ao tecido ósseo, mas é importante que mais estudos sejam realizados para entender como ele pode modular as outras

complicações da doença (embora com úlceras de perna não tenha sido encontrada associação estatisticamente significativa, mais estudos com N amostrais mais significativos são importantes para reforçar estes achados). Pode-se fazer alusão, por exemplo com a talassemia- α , que se mostra protetora para complicações de cunho hemolítico, mas pode ser um risco para complicações de cunho vaso-oclusivo (BELISÁRIO; VIANA, 2011).

Em relação à associação da dosagem de sKL com os polimorfismos, para o polimorfismo rs9536314 (T > G) não foi encontrada associação estatisticamente significativa. Em relação ao polimorfismo rs1207568 (G > A), os indivíduos GG apresentaram maior dosagem do que aqueles GA e AA. Esse achado está de acordo com alguns relatos da literatura que relatam que, devido à localização em região promotora, a troca do G > A estaria envolvida na interação com fatores de transcrição, diminuindo a transcrição e consequente tradução da proteína (DONATE-CORREA et al., 2016; KAWANO et al., 2002). Essa associação foi mantida mesmo quando foram analisados os indivíduos excluindo aqueles que tiveram osteonecrose. Este é o primeiro relato que traz a associação em indivíduos com anemia falciforme.

Os achados aqui relatados mostram que *KL* parece ser um importante modulador da AF, sendo interessante que mais grupos passem a pesquisá-lo a fim de entender como ele pode contribuir para o curso clínico e assim contribuir cada vez mais para o entendimento da modulação da doença.

7 CONCLUSÕES

Em indivíduos com anemia falciforme analisados no estudo:

- Indivíduos com genótipo GG para o polimorfismo *KL* rs211239 (A > G) mostraram maior frequência de crises vaso-oclusivas ao ano do que aqueles com genótipos AG e AA;
- Indivíduos com o genótipo GG para o polimorfismo *KL* rs685417 (G > A) apresentaram menor frequência de AVC, priapismo e menor número de complicações;
- Indivíduos com genótipo GG para o polimorfismo *KL* rs685417 (G > A) apresentaram menor probabilidade de desenvolver priapismo num mesmo intervalo de tempo quando comparados aos indivíduos GA e AA;
- Os polimorfismos rs9536314 (T > G) e rs1207568 (G > A) não se mostraram associados com as complicações clínicas analisadas;
- Indivíduos com osteonecrose apresentaram maior dosagem de KL solúvel do que os aqueles sem essa complicação;
- Indivíduos com genótipo GG para o polimorfismo rs1207568 apresentaram maior dosagem de KL solúvel do que os indivíduos com genótipos GA e AA.

REFERÊNCIAS

- ACIOLLY, Jessé Santiago. Anemia Falciforme – apresentação de um caso de infantilismo. **Tertúlias Acadêmicas [Arquivo da Universidade da Bahia – Faculdade de Medicina da Bahia]**, 2: 169-198, 1947.
- ADORNO, Elisângela Vitória et al. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 267–271, 2004. DOI: 10.1081/HEM-120040310.
- ALAVI, Afsaneh; KIRSNER, Robert S. Hemoglobinopathies and Leg Ulcers. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 213–216, 2015. DOI: 10.1177/1534734615600069.
- ALMEIDA, Antonio; ROBERTS, Irene. Bone involvement in sickle cell disease. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 129, p. 482–490, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05476.x.
- ARAÚJO, Maria Cristina Pignataro Emerenciano De; SERAFIM, Édvis Santos Soares; JR, Wivel Antonio Pereira de Castro; MEDEIROS, Tereza Maria Dantas De. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal , Rio Grande do Norte , Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 123–128, 2004.
- ARDUINI, Giovanna A. O.; TROVÓ DE MARQUI, Alessandra B. Prevalence and Characteristics of Priapism in Sickle Cell Disease. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 73–77, 2018. DOI: 10.1080/03630269.2018.1452760. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03630269.2018.1452760>.
- ARKING, Dan E. et al. Association of human aging with a functional variant of klotho. **PNAS**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 856–861, 2002.
- ARKING, Dan E.; ATZMON, Gil; ARKING, Albert; BARZILAI, Nir; DIETZ, Harry C. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. **Circulation Research**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 412–418, 2005. DOI: 10.1161/01.RES.0000157171.04054.30.
- ARKING, Dan E.; BECKER, Diane M.; YANEK, Lisa R.; FALLIN, Daniele; JUDGE, Daniel P.; MOY, Taryn F.; BECKER, Lewis C.; DIETZ, Harry C. KLOTHO Allele Status and the Risk of Early-Onset Occult Coronary Artery Disease. **Am J Hum Genet**, [S. l.], v. 72, p. 1154–1161, 2003.
- AURICCHIO, Maria Teresa Balester De Mello; VICENTE, João Pedro; MEYER, Diogo; MINGRONI-NETTO, Regina Célia. Frequency and origins of hemoglobin S mutation in African-derived Brazilian populations. **Human Biology**, [S. l.], v. 79, n. 6, p. 667–677, 2007. DOI: 10.1353/hub.2008.0017.
- BALDAN, Alessandro; GIUSTI, Andrea; BOSI, Cristina; MALAVENTURA, Cristina; MUSSO, Marco; FORNI, Gian Luca; VOLPATO, Stefano; ZULIANI, Giovanni; BORGNA-PIGNATTI, Caterina. Klotho, a new marker for osteoporosis and muscle

strength in β -thalassemia major. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 396–401, 2015. DOI: 10.1016/j.bcmd.2015.08.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.08.004>.

BALDWIN, Clinton et al. Association of klotho , bone morphogenic protein 6 , and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood**, [S. l.], v. 106, n. 1, p. 372–376, 2005. DOI: 10.1182/blood-2005-02-0548.Supported.

BALLAS, Samir K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 85, p. 6–13, 2010. DOI: 10.1002/ajh.21550.

BALLAS, Samir K. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Clinical hemorheology and microcirculation**, [S. l.], v. 68, n. 2–3, p. 105–128, 2018. DOI: 10.3233/CH-189002.

BELINI JUNIOR, Edis; SILVA, Danilo Grünig Humberto; TORRES, Lidiane de Souza; OKUMURA, Jéssika Viviani; LOBO, Clarisse Lopes de Castro; BONINI-DOMINGOS, Claudia Regina. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 321–327, 2015. DOI: 10.1016/j.bcmd.2015.01.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.011>.

BELISÁRIO, André Rolim; VIANA, Marcos Borato. Efeitos da Talassemia Alfa nas manifestações clínicas e hematológicas da Anemia Falciforme : uma revisão sistemática. **Rev Med Minas Gerais**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 319–330, 2011.

BEZERRA, Geraldo; DAHER, Elizabet De Fracesco; ROCHA, Francisco Airton Castro Da. Osteoarticular involvement in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 156–164, 2012. DOI: 10.5581/1516-8484.20120036.

BEZERRA, Marcos André C.; SANTOS, Magnun N. N.; ARAÚJO, Aderson S.; GOMES, Yara M.; ABATH, Frederico G. C.; BANDEIRA, Flavia M. G. C. MOLECULAR VARIATIONS LINKED TO THE GROUPING OF b - AND a -GLOBIN GENES IN NEONATAL PATIENTS WITH SICKLE CELL. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 83–88, 2007. DOI: 10.1080/03630260601057153.

BISWAL, Sebaranjan; RIZWAN, Huma; PAL, Sweta; SABNAM, Silpa; PARIDA, Preetinanda; PAL, Arttrana. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. **Hematology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 1–9, 2019. DOI: 10.1080/10245332.2018.1498441. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1498441>.

BITOUNGUI, Valentina J. Ngo; PULE, Gift D.; HANCHARD, Neil; NGOGANG, Jeanne. Beta-Globin Gene Haplotypes Among Cameroonians and Review of the Global Distribution : Is There a Case for a Single Sickle Mutation Origin in Africa ? **A Journal of Integrative Biology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 171–179, 2015. DOI: 10.1089/omi.2014.0134.

BORG, J. et al. KLF10 gene expression is associated with high fetal hemoglobin levels and with response to hydroxyurea treatment in beta-hemoglobinopathy patients. **Pharmacogenomics**, [S. l.], v. 13, n. 13, p. 1487–1500, 2012. DOI: 10.2217/pgs.12.125. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L365853845>.

BRASIL. **Doença Falciforme - Condutas básicas para tratamento**. 2012. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_condutas_basicas.pdf.

BRASIL. **Doença Falciforme - O que se deve saber sobre herança genética**. 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_deve_saber_sobre_heranca.pdf.

CANÇADO, Rodolfo D.; JESUS, Joice A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 204–206, 2007.

CARARO-LOPES, Marina Minto; MAZUCANTI, Caio Henrique Yokoyama; SCAVONE, Cristoforo; KAWAMOTO, Elisa Mitiko; BERWICK, Daniel Charles. The relevance of α -KLOTTHO to the central nervous system: Some key questions. **Ageing Research Reviews**, [S. l.], v. 36, p. 137–148, 2017. DOI: 10.1016/j.arr.2017.03.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2017.03.003>.

CARRILLO-LÓPEZ, Natalia; MARTÍNEZ-ARIAS, Laura; FERNÁNDEZ-VILLABRILLE, Sara; RUIZ-TORRES, María Piedad; DUSO, Adriana; CANNATA-ANDÍA, Jorge B.; NAVES-DÍAZ, Manuel; PANIZO, Sara. Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/ β -Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders. **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 108, n. 4, p. 439–451, 2021. DOI: 10.1007/s00223-020-00803-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00803-2>.

CESAR, Purim; DHYANI, Anamika; AUGUSTO SCHWADE, Luiz; ACORDI, Pollyana; XEREZ ALBUQUERQUE, Cinthia; NINA, Rejane; DE PAULA, Erich V.; FRAJLI, Nelson. Epidemiological, clinical, and severity characterization of sickle cell disease in a population from the Brazilian Amazon. **Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy**, [S. l.], n. xxxx, p. 0–6, 2019. DOI: 10.1016/j.hemonc.2019.04.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2019.04.002>.

CHAMORRO, Julián G.; CASTAGNINO, Jorge P.; MUSELLA, Rosa M.; NOGUERAS, Mabel; FRÍAS, Ana; VISCA, Mabel; AIDAR, Omar; COSTA, Lucas; DE LARRAÑAGA, Gabriela F. tagSNP rs1495741 as a useful molecular marker to predict antituberculosis drug-induced hepatotoxicity. **Pharmacogenetics and Genomics**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 357–361, 2016. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000224.

CHEIKHI, Amin et al. Klotho: An Elephant in Aging Research. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, [S. l.], v. 74, n. 7, p. 1031–1042, 2019. DOI: 10.1093/gerona/glz061.

CHEN, Jinzhong; YANG, Chengliang; YANG, Ye; LIANG, Qingyang; XIE, Kegong; LIU, Jia; TANG, Yujin. Targeting DKK1 prevents development of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head in rats. **American Journal of Translational Research**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 2320–2330, 2021.

CHOU, Stella T.; FASANO, Ross M. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 591–608, 2016. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.01.011.

CHUNG, Chih Ping et al. α -Klotho expression determines nitric oxide synthesis in response to FGF-23 in human aortic endothelial cells. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1–15, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0176817.

CLEVERS, Hans; NUSSE, Roel. Wnt/ β -catenin signaling and disease. **Cell**, [S. l.], v. 149, n. 6, p. 1192–1205, 2012. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012.

CONRAN, Nicola; COSTA, Fernando F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 18, p. 1824–1838, 2009. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.06.024>.

CONRAN, Nicola; FRANCO-PENTEADO, Carla F.; COSTA, Fernando F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009. DOI: 10.1080/03630260802625709.

CORREDOR, Zuray et al. Genetic Variants Associated with Chronic Kidney Disease in a Spanish Population. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41598-019-56695-2.

DALTON, George D.; XIE, Jian; AN, Sung Wan; HUANG, Chou Long. New insights into the mechanism of action of soluble klotho. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 8, n. NOV, p. 1–10, 2017. DOI: 10.3389/fendo.2017.00323.

DALTRO, Gildasio; FRANCO, Bruno Adelmo; FALEIRO, Thiago Batista; ROSÁRIO, Davi Araujo Veiga; DALTRO, Paula Braga; FORTUNA, Vitor. Osteonecrosis in sickle cell disease patients from Bahia, Brazil: a cross-sectional study. **International Orthopaedics**, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 1527–1534, 2018. DOI: 10.1007/s00264-018-3905-z.

DANESHGAR, Nastaran; DAI, Dao-fu. ROS, Klotho and mTOR in cardiorenal aging. **Aging**, [S. l.], v. 12, n. 20, 2020.

DOMINGOS, Igor F. et al. Influence of the β s haplotype and α -thalassemia on stroke development in a Brazilian population with sickle cell anaemia. **Ann Hematol**, [S. l.], v. 93, n. 2014, p. 1123–1129, 2014. DOI: 10.1007/s00277-014-2016-1.

DONATE-CORREA, Javier; MARTIN-NUNEZ, Ernesto; MARTINEZ-SANZ, Rafael; MUROS-DE-FUENTES, Mercedes; MORA-FERNANDEZ, Carmen; PEREZ-DELGADO, Nayra; NAVARRO-GONZALEZ, Juan F. Influence of Klotho gene

polymorphisms on vascular gene expression and its relationship to cardiovascular disease. **J Cell Mol Med**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 128–133, 2016. DOI: 10.1111/jcmm.12710.

ELGHOROURY, Eman A.; FADEL, Fatina I.; ELSHAMAA, Manal F.; KANDIL, Dina; SALAH, Doaa M.; EL-SONBATY, Marwa M.; FAROUK, Hebatallah; RAAFAT, Mona; NASR, Soha. Klotho G-395A gene polymorphism: impact on progression of end-stage renal disease and development of cardiovascular complications in children on dialysis. **Pediatric Nephrology**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1019–1027, 2018. DOI: 10.1007/s00467-017-3877-z.

ELLIOTT, Laine et al. Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 137, p. 262–267, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06560.x.

FAROOQ, Sajid; ABU OMAR, Mohannad; SALZMAN, Gary A. Acute chest syndrome in sickle cell disease. **Hospital practice (1995)**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 144–151, 2018. DOI: 10.1080/21548331.2018.1464363. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21548331.2018.1464363>.

FERTRIN, Kleber Y.; COSTA, Fernando Ferreira. Genomic polymorphisms in sickle cell disease : implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev Hematol**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 443–458, 2010.

FLEURY, Marcos. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro : Aspectos clínicos e laboratoriais. **RBAC**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 89–93, 2007.

FRIEDMAN, David J. et al. Klotho Variants and Chronic Hemodialysis Mortality. **Journal of bone and mineral research**, [S. l.], v. 24, n. 11, 2009. DOI: 10.1359/JBMR.090516.

GAARDER, A.; JONSEN, J.; LALAND, S.; HELLEM, A.; OWREN, P. A. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. **Nature**, [S. l.], 1961.

GLADWIN, Mark T.; OFORI-ACQUAH, Solomon F. Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. **Blood**, [S. l.], v. 123, n. 24, p. 3689–3690, 2014. DOI: 10.1182/blood-2014-03-563874.

HABARA, Alawi; STEINBERG, Martin H. Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 241, p. 689–696, 2016. DOI: 10.1177/1535370216636726.

HAHN, Gabriela Fernandes; OLIVEIRA, Jarbas Rodrigues De; BOCK, Patricia Martins. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 203–213, 2017. DOI: 10.4322/2357-9730.73884.

HAO, Qiukui; WANG, Yuting; DING, Xiang; DONG, Biao; YANG, Ming; DONG,

Birong; WEI, Yuquan. G-395A polymorphism in the promoter region of the KLOTHO gene associates with frailty among the oldest-old. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25040-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-25040-4>.

HELMS, C. C. et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. **J Thromb Haemost**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 2148–2154, 2013.

HELVACI, Nafiye; KABACAM, Serkan; DAGDELEN, Selcuk; LAY, Incilay; KARABULUT, Erdem; MUT, Melike; ALIKASIFOGLU, Mehmet; ERBAS, Tomris. Klotho gene G395A and C1818T polymorphisms in acromegaly: Association with clinical presentation and comorbidities. **Clinical Endocrinology**, [S. l.], n. May, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1111/cen.14380.

HERRICK, James B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. VI, n. 5, p. 517–521, 1910. DOI: 10.1001/archinte.1910.00050330050003.

HIGGS, Douglas R. et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 306, n. 24, 1982.

HOWARD, Jo; HART, Nicholas; ROBERTS-HAREWOOD, Marilyn; CUMMINS, Michelle; AWOGBADE, Moji; DAVIS, Bernard. Guideline on the management of acute chest syndrome in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 169, n. 4, p. 492–505, 2015. DOI: 10.1111/bjh.13348.

HUM, Julia M.; O'BRYAN, Linda; SMITH, Rosamund C.; WHITE, Kenneth E. Novel functions of circulating Klotho. **Bone**, [S. l.], v. 100, n. 317, p. 36–40, 2017. DOI: 10.1016/j.bone.2016.11.025.

HUTTLE, Alexandra; MAESTRE, Gladys; LANTIGUA, Rafael; GREEN, Nancy S. Sickle Cell in Sickle Cell Disease in Latin America and the United States. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 62, n. 5, p. 1131–1136, 2015. DOI: 10.1002/pbc.

IMAMURA, Akiko; OKUMURA, Kenji; OGAWA, Yasuhiro; MURAKAMI, Ryuichiro; TORIGOE, Masayuki; NUMAGUCHI, Yasushi; MUROHARA, Toyooki. Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 371, n. 1–2, p. 66–70, 2006. DOI: 10.1016/j.cca.2006.02.021.

INGRAM, V. M. A Specific Chemical Difference Between the Globins of Normal Human and Sickle. **Nature**, [S. l.], v. 178, 1956.

INVIDIA, Laura; SALVIOLI, Stefano; ALTILIA, Serena; PIERINI, Michela; PANOURGIA, Maria P.; MONTI, Daniela; DE RANGO, Francesco; PASSARINO, Giuseppe; FRANCESCHI, Claudio. The frequency of Klotho KL-VS polymorphism in a large Italian population, from young subjects to centenarians, suggests the presence of specific time windows for its effect. **Biogerontology**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 67–73, 2010. DOI: 10.1007/s10522-009-9229-z.

JACOB, Seethal A. et al. Thrombospondin-1 gene polymorphism is associated with estimated pulmonary artery pressure in patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. E31–E34, 2017. DOI: 10.1002/ajh.24635.

KAMAL, Asmaa; SALAMA, Mohamed; KAMAL, Amr; MOHSEN, Ahmed; SIAM, Ibrahim. Klotho (rs1207568 and rs564481) Gene Variants and Colorectal Cancer Risk. **Turkish Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 497–502, 2020. DOI: 10.5152/TJG.2020.19235.

KATO, Gregory J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 4, p. 1–22, 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.

KATO, Gregory J.; GLADWIN, Mark T.; STEINBERG, Martin H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KATO, Gregory J.; STEINBERG, Martin H.; GLADWIN, Mark T. **Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease**. **Journal of Clinical Investigation**, 2017. DOI: 10.1172/JCI89741.

KATO, Yukinari et al. Establishment of the Anti-Klotho Monoclonal Antibodies and Detection of Klotho Protein in Kidneys. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 267, p. 597–602, 2000. DOI: 10.1006/bbrc.1999.2009.

KAWANO, Ken-ichi et al. Klotho Gene Polymorphisms Associated With Bone Density of Aged Postmenopausal Women. **Journal of bone and mineral research**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1744–1751, 2002.

KIRSTETTER, Peggy; ANDERSON, Kristina; PORSE, Bo T.; JACOBSEN, Sten Eirik W.; NERLOV, Claus. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. **Nature immunology**, [S. l.], v. 7, n. 10, p. 1048–1056, 2006. DOI: 10.1038/ni1381.

KITAGAWA, Masashi et al. A Decreased Level of Serum Soluble Klotho Is an Independent Biomarker Associated with Arterial Stiffness in Patients with Chronic Kidney Disease. **Plos One**, [S. l.], v. 8, n. 2, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0056695.

KOMABA, Hirotaka et al. Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. **Kidney International**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 599–611, 2017. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.014>.

KURO-O, Makoto et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, [S. l.], v. 390, p. 45–51, 1997.

KURO-O, Makoto. The Klotho proteins in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 27–44, 2019. DOI: 10.1038/s41581-018-0078-3.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-018-0078-3>.

KUROSU, Hiroshi et al. Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. **Science**, [S. l.], v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 2005. DOI: 10.1126/science.1112766.Suppression.

KUROSU, Hiroshi; KURO-O, Makoto. The Klotho gene family as a regulator of endocrine fibroblast growth factors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 299, n. 1, p. 72–78, 2009. DOI: 10.1016/j.mce.2008.10.052.

LEE, Richard; WEBER, Thomas J. Disorders of phosphorus homeostasis. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 561–567, 2010. DOI: 10.1097/MED.0b013e32834041d4.Disorders.

LIM, Kenneth et al. a-Klotho Expression in Human Tissues. **J Clin Endocrinol Metab**, [S. l.], v. 100, n. 10, p. 1308–1318, 2015. DOI: 10.1210/jc.2015-1800.

LIU, Lu et al. Klotho attenuated antibody-mediated porcine endothelial cell activation and injury. **Xenotransplantation**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1111/xen.12286.

LIU, Shiguang; QUARLES, L. Darryl. How Fibroblast Growth Factor 23 Works. **J Am Soc Nephrol**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1637–1647, 2007. DOI: 10.1681/ASN.2007010068.

MAEKAWA, Yoshihiro; ISHIKAWA, Kazuhiko; YASUDA, Osamu; OGURO, Ryosuke; HANASAKI, Hiroko; KATSUYA, Tomohiro; RAKUGI, Hiromi. Klotho suppresses TNF- α -induced expression of adhesion molecules in the endothelium and attenuates NF- κ B activation. **Endocr**, [S. l.], v. 35, p. 341–346, 2009. DOI: 10.1007/s12020-009-9181-3.

MARTÍN-NÚÑEZ, Ernesto; DONATE-CORREA, Javier; MUROS-DE-FUENTES, Mercedes; MORA-FERNÁNDEZ, Carmen; NAVARRO-GONZÁLEZ, Juan F. Implications of Klotho in vascular health and disease. **World Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 1262–1269, 2014. DOI: 10.4330/wjc.v6.i12.1262.

MARTINS, Paulo Roberto Juliano; MORAES-SOUZA, Hélio; SILVEIRA, Talita Braga. Morbidity-mortality in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 38–383, 2010.

MATSUMURA, Yutaka; AIZAWA, Hiroki; SHIRAKI-IIDA, Takako; NAGAI, Ryozi; KURO-O, Makoto; NABESHIMA, Yo-ichi. Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 630, n. 242, p. 626–630, 1998.

MENCKE, Rik; HILLEBRANDS, Jan-Luuk. The Role of the Anti-Ageing Protein Klotho in Vascular Physiology and Pathophysiology. **Ageing research reviews**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.arr.2016.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.001>.

MILNER, P. F. et al. Sick cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. **The New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 325, n. 21, 1991.

MINNITI, C. P.; ECKMAN, J.; SEBASTIANI, P.; STEINBERG, M. H.; BALLAS, S. K. Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 85, n. 10, p. 831–833, 2010. DOI: 10.1002/ajh.21838.

MUÑOZ-CASTAÑEDA, Juan Rafael; RODELO-HAAD, Cristian; PENDON-RUIZ DE MIER, Maria Victoria; MARTIN-MALO, Alejandro; SANTAMARIA, Rafael; RODRIGUEZ, Mariano. Klotho/FGF23 and Wnt signaling as important players in the comorbidities associated with chronic kidney disease. **Toxins**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3390/toxins12030185.

MURER, Heini; FORSTER, Ian; BIBER, Jürg. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 447, n. 5, p. 763–767, 2004. DOI: 10.1007/s00424-003-1072-5.

NAGAI, R.; SAITO, Y.; OHYAMA, Y.; AIZAWA, H.; SUGA, T.; NAKAMURA, T.; KURABAYASHI, M.; KURO-O, M. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal. **Cellular and molecular life sciences**, [S. l.], v. 57, p. 738–746, 2000.

NAKAMURA, Tetsuya; SAITO, Yuichiro; OHYAMA, Yoshio; MASUDA, Hiroaki; SUMINO, Hiroyuki; KURO-O, Makoto; NABESHIMA, Youichi; NAGAI, Ryozi; KURABAYASHI, Masahiko. Production of Nitric Oxide, but Not Prostacyclin, Is Reduced in Klotho Mice. **Jpn J Pharmacol**, [S. l.], v. 89, p. 149–156, 2002.

NOLAN, Vikki G.; ADEWOYE, Adeboye; BALDWIN, Clinton; WANG, Ling; MA, Qianli; DIEGO, F.; FARRELL, John J.; SEBASTIANI, Paola; STEINBERG, Martin H. Sick Cell Leg Ulcers: Associations with Haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and Genes of the TGF- β /BMP Pathway. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 133, n. 5, p. 570–578, 2006. a.

NOLAN, Vikki G.; ADEWOYE, Adeboye; BALDWIN, Clinton; WANG, Ling; MA, Qianli; WYSZYNSKI, Diego F.; JOHN, J.; SEBASTIANI, Paola; LINDSAY, A. Sick cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β / BMP pathway. **British Journal of Haematology**, [S. l.], p. 570–578, 2006. b. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06074.x.

NOLAN, Vikki G.; BALDWIN, Clinton; MA, Qianli; WYSZYNSKI, Diego F.; FARRELL, John J.; BISBEE, Alice; EMBURY, Stephen H.; FARRER, Lindsay A.; STEINBERG, Martin H. Association of single nucleotide polymorphisms in klotho with priapism in sickle cell anaemia. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 128, p. 266–272, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05295.x.

NOVELLI, Enrico M.; GLADWIN, Mark T. Crises in sickle cell disease. **Chest**, [S. l.], v. 149, n. 4, p. 1082–1093, 2016. DOI: 10.1016/j.chest.2015.12.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2015.12.016>.

NZIETCHUENG, Rosine; EL SHAMIEH, Said; BENACHOUR, Hamanou; LABAT,

Carlos; HERBETH, Bernard; NDIAYE, Ndeye Coumba; MASSON, Christine; VISVIKIS-SIEST, Sophie; BENETOS, Athanase. Klotho KL-VS genotype is involved in blood pressure regulation. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 412, n. 19–20, p. 1773–1777, 2011. DOI: 10.1016/j.cca.2011.05.032. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.05.032>.

OGATA, N.; MATSUMURA, Y.; SHIRAKI, M.; KAWANO, K.; KOSHIZUKA, Y.; HOSOI, T.; NAKAMURA, K.; KURO-O, M.; KAWAGUCHI, H. Association of Klotho Gene Polymorphism With Bone Density and Spondylosis of the Lumbar Spine in Postmenopausal Women. **Bone**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 37–42, 2002.

OHENE-FREMPONG, By Kwaku; WEINER, Steven J.; SLEEPER, Lynn A.; MILLER, Scott T.; EMBURY, Stephen; MOOHR, John W.; WETHERS, Doris L.; PEGELOW, Charles H.; GILL, Frances M. Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. **Blood**, [S. l.], p. 288–294, 1998.

OLIVEIRA, Rodrigo Bueno De; MIYSÉS, Rosa Maria Affonso. FGF-23: estado da arte. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 323–331, 2010.

PACHECO, Ana Paula Almeida de Souza; GONÇALVES, Marilda. Klotho : its various functions and association with sickle cell disease subphenotypes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 430–436, 2014.

PAGNIER, Joste; MEARST, J. Gregory; DUNDA-BELKHODJA, Olga; SCHAEFER-REGOT, K. I. M. E.; BELDJORD, Cherif; NAGELT, Ronald L.; LABIE, Dominique. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci USA**, [S. l.], v. 81, n. March, p. 1771–1773, 1984.

PAKO, Judit; BIKOV, Andras; BARTA, Imre; MATSUEDA, Hideyo; PUSKAS, Rita; GALFFY, Gabriella; KERPEL-FRONIUS, Anna; ANTUS, Balazs; HORVATH, Ildiko. Assessment of the circulating klotho protein in lung cancer patients. **Pathology and Oncology Research**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 233–238, 2020. DOI: 10.1007/s12253-018-0441-5.

PALADINO, Silvia F. Úlcera de membros inferiores na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 288–290, 2007.

PAULA, Roberta S. et al. Serum Klotho (but not haplotypes) associate with the post-myocardial infarction status of older adults. **Clinics**, [S. l.], v. 71, n. 12, p. 725–732, 2016. DOI: 10.6061/clinics/2016(12)09.

PAULING, Linus; ITANO, Harvey A.; SINGER, S. J.; WELLS, Ibert C. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, [S. l.], v. 110, n. 3, 1949.

PAVLÚ, Jiří; AHMED, Riaz E.; O'REGAN, Declan P.; PARTRIDGE, John; LEFROY, David C.; LAYTON, D. Mark. Myocardial infarction in sickle-cell disease. **Lancet**, [S. l.], v. 369, n. 9557, p. 246, 2007. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60114-7.

PEDERSEN, Lise; MØLLER, Susanne; LOHMAN, Claus; MELHOLT, Lars. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays.

Clinical Biochemistry, [S. l.], v. 46, n. 12, p. 1079–1083, 2013. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.05.046. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.05.046>.

QUINN, Charles T. Sickle cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. **Pediatric clinics of North America**, [S. l.], v. 60, n. 6, p. 1363–81, 2013. DOI: 10.1016/j.pcl.2013.09.006.

REES, David C.; WILLIAMS, Thomas N.; GLADWIN, Mark T. Sickle-cell disease. **Lancet**, [S. l.], v. 376, n. 9757, p. 2018–31, 2010. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131035>. Acesso em: 10 jul. 2014.

REVELAS, Mary et al. Review and meta-analysis of genetic polymorphisms associated with exceptional human longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, [S. l.], v. 175, n. June, p. 24–34, 2018. DOI: 10.1016/j.mad.2018.06.002.

RHEE, Eun-jung et al. The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. **Metabolism Clinical and Experimental**, [S. l.], v. 55, p. 1344–1351, 2006. DOI: 10.1016/j.metabol.2006.05.020.

RICHTER, Beatrice; HALLER, Jacqueline; HAFFNER, Dieter; LEIFHEIT-NESTLER, Maren. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. **European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 468, p. 1621–1635, 2016. DOI: 10.1007/s00424-016-1858-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1858-x>.

ROTONDI, Silverio; PASQUALI, Marzia; TARTAGLIONE, Lida; MUCI, Maria Luisa; MANDANICI, Giusy; LEONANGELI, Cristiana; SALES, Silvia; FARCOMENI, Alessio; MAZZAFERRO, Sandro. Soluble α -Klotho serum levels in chronic kidney disease. **International Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/872193.

SAITO, Yuichiro et al. Klotho Protein Protects against Endothelial Dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 248, p. 324–329, 1998.

SAITO, Yuichiro et al. In Vivo klotho Gene Delivery Protects against Endothelial Dysfunction in Multiple Risk Factor Syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 276, p. 767–772, 2000. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3470.

SCAZZONE, Concetta et al. Klotho and vitamin D in multiple sclerosis: An Italian study. **Archives of Medical Science**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 842–847, 2020. DOI: 10.5114/aoms.2019.86969.

SEBASTIANI, Paola et al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. **American Journal of**

Hematology, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 29–35, 2010. DOI: 10.1002/ajh.21572.Genetic.

SEIBERT, Eric; RADLER, Daniel; ULRICH, Christof; HANIKA, Sylvia; FIEDLER, Roman; GIRNDT, Matthias. Serum klotho levels in acute kidney injury. **Clinical Nephrology**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 173–179, 2017. DOI: 10.5414/CN108970.

SEMBA, Richard D.; CAPPOLA, Anne R.; SUN, Kai; BANDINELLI, Stefania; DALAL, Mansi; CRASTO, Candace; GURALNIK, Jack M.; FERRUCCI, Luigi. Plasma Klotho and cardiovascular disease in adults. **J Am Geriatr Soc**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 1596–1601, 2011. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2011.03558.x.Plasma.

SHEN, Yue; YAN, Yucheng; LU, Liming; QIAN, Yingying; GUAN, Xuejing; ZHANG, Lulu; QI, Yuanyuan; GU, Leyi; DING, Feng. Klotho ameliorates hydrogen peroxide-induced oxidative injury in TCMK-1 cells. **International Urology and Nephrology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 787–798, 2018. DOI: 10.1007/s11255-017-1765-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1765-x>.

SHIMADA, Takashi; KAKITANI, Makoto; YAMAZAKI, Yuji; HASEGAWA, Hisashi; TAKEUCHI, Yasuhiro; FUJITA, Toshiro; FUKUMOTO, Seiji; TOMIZUKA, Kazuma; YAMASHITA, Takeyoshi. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 113, n. 4, p. 561–568, 2004. DOI: 10.1172/JCI200419081.

SHRINER, Daniel; ROTIMI, Charles N. Whole-Genome-Sequence-Based Haplotypes Reveal Single Origin of the Sickle Allele during the Holocene Wet Phase. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 547–556, 2018. DOI: 10.1016/j.ajhg.2018.02.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.003>.

SILVEIRA, Marcos Pimentel; GUEDES, Alex; DALTRO, Gildásio. Osteonecrose Da Cabeça Umeral Na Anemia Falciforme. **Gazeta Médica da Bahia**, [S. l.], v. 80, p. 80–84, 2010.

SIX, Isabelle; OKAZAKI, Hirokazu; GROSS, Priscilla; CAGNARD, Joanna; BOUDOT, Cédric; MAIZEL, Julien; DRUEKE, Tilman B.; MASSY, Ziad A. Direct, acute effects of Klotho and FGF23 on vascular smooth muscle and endothelium. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 4, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0093423.

SŁOMIŃSKI, Bartosz; RYBA-STANISŁAWOWSKA, Monika; SKRZYPKOWSKA, Maria; MYŚLIWSKA, Jolanta; MYŚLIWIEC, Małgorzata. The KL-VS polymorphism of KLOTHO gene is protective against retinopathy incidence in patients with type 1 diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [S. l.], v. 1864, n. 3, p. 758–763, 2018. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.12.015.

SOERENSEN, Mette et al. Human Longevity and Variation in GH/IGF-1/Insulin Signaling, DNA Damage Signaling and Repair and Pro/antioxidant Pathway Genes: Cross Sectional and Longitudinal Studies. **Exp Gerontol**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 379–387, 2012. DOI: 10.1016/j.exger.2012.02.010.Human.

SOUZA, Claudia R. Lustosa; SHIMMOTO, Marily M. Azevedo; VICARI, Perla; MECABO, Grazielle; ARRUDA, Martha Mariana; FIGUEIREDO, Maria Stella. Klotho gene polymorphisms and their association with sickle cell disease phenotypes.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 275–276, 2015. DOI: 10.1016/j.bjhh.2015.02.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.02.009>.

STEFANOPOULOS, Dimitrios et al. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and Klotho Protein in Beta-Thalassemia. **Hormone and Metabolic Research**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 194–201, 2020. DOI: 10.1055/a-1104-5326.

STEINBERG, M. H. Modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. **Hemoglobin**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–19, 1996.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 129, p. 465–481, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05411.x.

STEINBERG, Martin H. Sickle Cell Anemia , the First Molecular Disease : Overview of Molecular Etiology , Pathophysiology , and Therapeutic Approaches. [S. l.], p. 1295–1324, 2008. a. DOI: 10.1100/tsw.2008.157.

STEINBERG, Martin H. SNPing away at sickle cell pathophysiology. **Blood**, [S. l.], v. 111, n. 12, 2008. b.

STEINBERG, Martin H.; EMBURY, Stephen H. Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, [S. l.], v. 68, n. 5, p. 985–990, 1986.

STEINBERG, Martin H.; SEBASTIANI, Paola. Genetic Modifiers of Sickle Cell Disease. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 87, n. 8, p. 795–803, 2012. DOI: 10.1002/ajh.23232.

STRAM, Daniel O. Tag SNP selection for association studies. **Genetic Epidemiology**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 365–374, 2004. DOI: 10.1002/gepi.20028.

SUNDD, Prithu; GLADWIN, Mark T.; NOVELLI, Enrico M. Pathophysiology of sickle cell disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, [S. l.], v. 14, p. 263–92, 2019. DOI: 10.7748/en2002.02.9.9.19.c1404.

SWITZER, Jeff A.; HESS, David C.; NICHOLS, Fenwick T.; ADAMS, Robert J. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease : present and future. **Lancet Neurol**, [S. l.], v. 5, n. June, p. 501–512, 2006.

TANGRI, Navdeep; ALAM, Ahsan; WOOTEN, Eric C.; HUGGINS, Gordon S. Lack of association of Klotho gene variants with valvular and vascular calcification in Caucasians: A candidate gene study of the Framingham Offspring Cohort. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 3998–4002, 2011. DOI: 10.1093/ndt/gfr188.

TAYLOR, James G.; NOLAN, Vikki G.; MENDELSON, Laurel; KATO, Gregory J.;

GLADWIN, Mark T.; STEINBERG, Martin H. Chronic Hyper-Hemolysis in Sick Cell Anemia : Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasoocclusive Pain. **Plos One**, [S. l.], v. 3, n. 5, 2008. DOI: 10.1371/journal.pone.0002095.

ULUG, Pinar; VASAVDA, Nisha; AWOGBADE, Moji; CUNNINGHAM, Juliette; MENZEL, Stephan; THEIN, Swee Lay. Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. **Ann Hematol**, [S. l.], v. 88, p. 803–805, 2009. DOI: 10.1007/s00277-008-0659-5.

URAKAWA, Itaru; YAMAZAKI, Yuji; SHIMADA, Takashi; IJIMA, Kousuke; HASEGAWA, Hisashi; OKAWA, Katsuya; FUJITA, Toshiro; FUKUMOTO, Seiji; YAMASHITA, Takeyoshi. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, [S. l.], v. 444, n. 7120, p. 770–774, 2006. DOI: 10.1038/nature05315.

VICARI, Perla; FIGUEIREDO, Maria Stella. Priapismo na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 275–278, 2007.

VILLAGRA, José; SHIVA, Sruti; HUNTER, Lori A.; MACHADO, Roberto F.; GLADWIN, Mark T.; KATO, Gregory J. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood**, [S. l.], v. 110, n. 6, p. 2166–2172, 2007. DOI: 10.1182/blood-2006-12-061697.

WANG, Hu Lin; XU, Qiang; WANG, Zhang; ZHANG, Yi Hua; SI, Liang Yi; LI, Xue Jun; YANG, Qi Hong; XIAO, Hang. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. **Clinica Chimica Acta**, [S. l.], v. 411, n. 5–6, p. 386–390, 2010. DOI: 10.1016/j.cca.2009.12.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2009.12.004>.

WARE, Russell E.; DE MONTALEMBERT, Mariane; TSHILOLO, Léon; ABOUD, Miguel R. Sick cell disease. **The Lancet**, [S. l.], v. 390, n. 10091, p. 311–323, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30193-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9).

WILLIAMS, Thomas N.; THEIN, Swee Lay. Sick Cell Anemia and Its Phenotypes. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 113–147, 2018. DOI: 10.1146/annurev-genom-083117-021320.

WU, Fei; JIAO, Jing; LIU, Feng; YANG, Yue; ZHANG, Shanfeng; FANG, Zhenhua; DAI, Zhipeng; SUN, Zhibo. Hypermethylation of Frizzled1 is associated with Wnt/ β -catenin signaling inactivation in mesenchymal stem cells of patients with steroid-associated osteonecrosis. **Experimental and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 51, n. 2, 2019. DOI: 10.1038/s12276-019-0220-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-019-0220-8>.

XU, X.; LIANG, X.; HU, G.; ZHANG, J.; LEI, H. Renal function and klotho gene polymorphisms among Uygur and Kazak populations in Xinjiang, China. **Medical**

Science Monitor, [S. l.], v. 21, p. 44–51, 2015. DOI: 10.12659/MSM.891213. Disponível em: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84920261177&doi=10.12659%2FMSM.891213&partnerID=40&md5=b3577efb79565d16cd66e08a828512f6>.

YANG, Ke; YANG, Jiangxin; BI, Xianjin; YU, Zhikai; XIAO, Tangli; HUANG, Yinghui; LIU, Yong; XIONG, Jiachuan; ZHAO, Jinghong. Serum Klotho, Cardiovascular Events, and Mortality in Nondiabetic Chronic Kidney Disease. **CardioRenal Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 175–187, 2020. DOI: 10.1159/000506380.

YILMAZ, V. T.; OZDEM, S.; L, Donmez; CETINKAYA, R.; SULEYMANLAR, G.; ERSIY, F. F. FGF-23 , α -Klotho Gene Polymorphism and Their Relationship with the Markers of Bone Metabolism in Chronic Peritoneal Dialysis Patients. **The Eurasian Journal of Medicine**, [S. l.], v. 47, p. 115–125, 2015. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2015.93.

ZAGO, Marco A. et al. Atypical Bs haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. **American Journal of Hematology**, [S. l.], v. 63, p. 63–79, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8652(200002)63.

ZAGO, Marco Antonio; PINTO, Ana Cristina Silva. Fisiopatologia das doenças falciformes : da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.

ZHANG, F.; ZHAI, G.; KATO, B. S.; HART, D. J.; HUNTER, D.; SPECTOR, T. D.; P, F. R. C.; AHMADI, K. R. Association between KLOTHO gene and hand osteoarthritis in a female Caucasian population. **OsteoArthritis and cartilage**, [S. l.], v. 15, p. 624–629, 2007. DOI: 10.1016/j.joca.2006.12.002.

ZHENG, Shubei; CHEN, Yan; ZHENG, Yu; ZHOU, Zhihong; LI, Zhanyuan. Correlation of serum levels of fibroblast growth factor 23 and Klotho protein levels with bone mineral density in maintenance hemodialysis patients. **European Journal of Medical Research**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1186/s40001-018-0315-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40001-018-0315-z>.

ANEXO A NORMAS DA REVISTA "ANNALS OF HEMATOLOGY"

Instructions for Authors

General Information

Please note that the journal does not offer pre-evaluation. Therefore please directly submit your manuscript to Editorial Manager at the link below. The Editor will then contact you.

It is the Corresponding Author's responsibility to ensure that he/she has the correct authors' names, affiliations, addresses and author sequence when the final corrected proofs are submitted. Please keep in mind that corrections are no longer possible after online first publication. All additional corrections need the approval of the Editor-in-Chief(s) and would result in the publication of an erratum that will be hyperlinked to the article.

Types of papers

Annals of Hematology welcomes Review Articles, Original Articles, and Letters to the Editor.

Letters to the Editor: Comments on published papers or reports of illustrative cases are welcome, but should not exceed 500 words, 10 references, and 1 figure/table. They should contain an illustrative title, but no abstract or subheadings.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for all articles, including articles with biological applications

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Additional declarations for articles in life science journals that report the results of studies involving humans and/or animals

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (Download zip, 190 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.: *Italic* for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative) **Bold** for vectors, tensors, and matrices.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].

2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

-Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J Appl Physiol 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. N Engl J Med 341:325–329

-Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

-Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

-Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

-Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

-Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

-All tables are to be numbered using Arabic numerals.

-Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

-For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

-Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

-Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

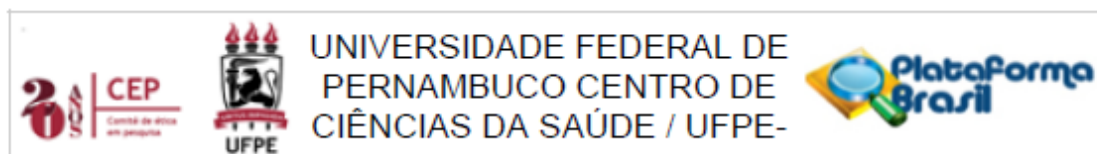
Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

ANEXO B PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MODULAÇÃO CLÍNICA DA ANEMIA FALCIFORME POR VARIÁVEIS NO GENE KLOTHO

Pesquisador: Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 95188618.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

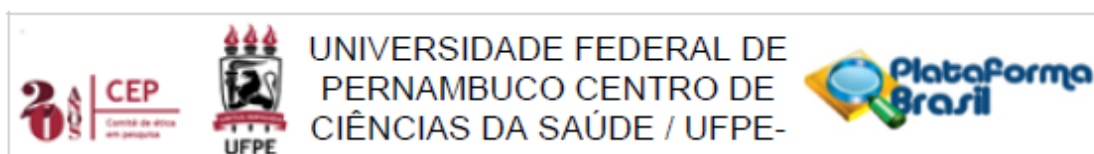
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.965.710

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado "Análise da modulação clínica da anemia falciforme por variáveis no gene klotho" foi apresentado pela estudante de Doutorado do Programa da Pós Graduação em Genética da UFPE, Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista, sob a orientação do Prof. Marcos André Cavalcanti Bezerra. A anemia falciforme é uma condição clínica heterogênea de mutação única que leva à síntese da HbS em detrimento da hemoglobina normal (HbA). O projeto visa avaliar polimorfismos no gene klotho, a sua expressão em nível de RNA mensageiro e proteína e a associação desses achados com as complicações clínicas da doença e também com os níveis de outras moléculas importantes na fisiopatologia da anemia falciforme. A amostra será constituída de 900 pacientes portadores de anemia falciforme, não relacionados, acompanhados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Recife-PE. De todos os pacientes serão analisados os perfis clínicos, laboratoriais e moleculares e os mesmos serão divididos em grupo caso (sendo composto pelos pacientes que apresentarem complicações clínicas relatadas no prontuário) e grupo controle (indivíduos acima de 18 anos que não tenham desenvolvido nenhuma das principais complicações clínicas decorrentes da doença, como doença cerebrovascular, úlceras de perna, osteonecrose, síndrome torácica aguda e priapismo).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.965.710

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar polimorfismos no gene KLOTHO, a sua expressão em nível de RNA mensageiro e proteína e a associação desses achados com as complicações clínicas da doença e também com os níveis de outras moléculas importantes na fisiopatologia da AF: VCAM-1, ICAM-1, nitrato e nitrito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os indivíduos que aceitar participar não estarão sujeitos a grandes riscos, existindo apenas a possibilidade de incômodo no momento da coleta de sangue e formação de um pequeno hematoma no local. Esses riscos, entretanto, serão minimizados pelo fato de que será realizado por profissionais treinados e qualificados da Fundação Hemope.

Benefícios:

O estudo visa auxiliar na determinação de um marcador molecular que possa indicar um bom ou mal prognóstico da doença, podendo auxiliar no tratamento do paciente desde o início.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os ajustes sugeridos foram aceitos e realizados na metodologia e no TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados e as correções foram realizadas satisfatoriamente.

Recomendações:

nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

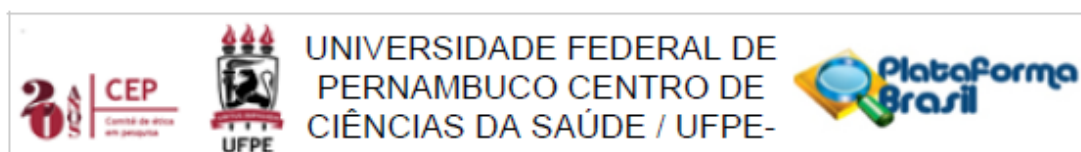
Nenhuma. Considero o projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

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



Continuação do Parecer: 2.965.710

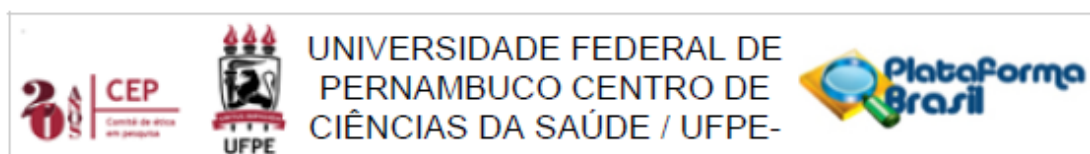
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1097833.pdf	16/10/2018 09:32:41		Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias.docx	16/10/2018 09:31:34	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pendencia_corrigida.docx	16/10/2018 09:30:38	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_LIVRE_ESCLARECIDO_compendenciacorrigida.docx	16/10/2018 09:29:59	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_ESCLARECIDO_PARA_MAIORES_DE_18_ANOScom_pendencia_corrigida.docx	16/10/2018 09:29:38	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MENORES_IDADE_com_pendencia_corrigida.docx	12/10/2018 17:54:37	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Outros	declaracao_vinculo_jessica.pdf	03/08/2018 10:52:56	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_e_confidenc	03/08/2018	Jéssica Vitória	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.965.710

Outros	ialidade_assinado_2018.pdf	10:50:44	Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Outros	Curriculo_LATTES_ANTONIO.pdf	03/08/2018 10:50:02	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Outros	LATTES_MARCOS.pdf	03/08/2018 10:49:45	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Outros	LATTES_JESSICA.pdf	03/08/2018 10:49:30	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Outros	anuencia_hemope_assinada.pdf	03/08/2018 10:48:43	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	03/08/2018 10:38:19	Jéssica Vitória Gadelha de Freitas Batista	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 17 de Outubro de 2018

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br

ANEXO C CURRICULUM VITAE (LATTES)

Artigos completos publicados em periódicos

1. **BATISTA, JÉSSICA V. G. F.** ; ARCANJO, GABRIELA S. ; BATISTA, THAIS H. C. ; SOBREIRA, MARCONDES J. ; SANTANA, RODRIGO M. ; DOMINGOS, IGOR F. ; HATZLHOFFER, BETÂNIA L. ; FALCÃO, DIEGO A. ; PEREIRA-MARTINS, DIEGO A. ; OLIVEIRA, JÉSSICA M. ; ARAUJO, AMANDA S. ; LARANJEIRA, LUANA P. M. ; MEDEIROS, FERNANDA S. ; ALBUQUERQUE, FLÁVIA P. ; ALBUQUERQUE, DULCINÉIA M. ; SANTOS, MAGNUN N. ; HAZIN, MANUELA F. ; DOS ANJOS, ANA C. ; COSTA, FERNANDO F. ; ARAUJO, ADERSON S. ; LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO R. ; BEZERRA, MARCOS A. .Influence of UGT1A1 promoter polymorphism, α -thalassemia and β s haplotype in bilirubin levels and cholelithiasis in a large sickle cell anemia cohort. ANNALS OF HEMATOLOGY, v. 100, p. 903-911, 2021.
2. HATZLHOFFER, BETÂNIA LUCENA DOMINGUES PEREIRA-MARTINS, DIEGO ANTONIO DE FARIAS DOMINGOS, IGOR ARCANJO, GABRIELA DA SILVA WEINHÄUSER, ISABEL FALCÃO, DIEGO ARRUDA FARIAS, ISABELA CRISTINA CORDEIRO, **DE FREITAS BATISTA, JÉSSICA VITÓRIA GADELHA**, PRADO, LUANA PRISCILLA LARANJEIRA OLIVEIRA, JÉSSICA MARIA FLORENCIO BATISTA, THAIS HELENA CHAVES SOBREIRA, MARCONDES JOSÉ DE VASCONCELOS COSTA DE SANTANA, RODRIGO MARCIONILO ARAÚJO, AMANDA BEZERRA DE SÁ DE MELO, MANUELA ALBUQUERQUE DEANCÂNTARA, BRUNA VASCONCELOS COELHO-SILVA, JUAN LUIZ DE MOURA RAFAEL, ANA BEATRIZ LUCAS DE LIMA SILVA, DANÍZIA MENEZES ALBUQUERQUE, FLÁVIA PEIXOTO SANTOS, MAGNUN NUELDO NUNES DOS ANJOS, ANA CLÁUDIA COSTA, FERNANDO FERREIRA DA SILVA ARAÚJO,

ADERSON LUCENA-ARAÚJO, ANTONIO ROBERTO, et al. ; Alpha thalassemia, but not β S-globin haplotypes, influence sickle cell anemia clinical outcome in a large, single-center Brazilian cohort. ANNALS OF HEMATOLOGY, v. 100, p. 921-931, 2021.

3. VARELA, N. M. T.; **BATISTA, J. V. G. F.**; CARVALHO, A. M. C.; NASCIMENTO, F. R. B. D.; BEZERRA, M. A. C. ANALYSIS OF THE INCIDENCE OF HAEMOGLOBIN S IN NEWBORNS IN PERNAMBUCO, BRAZIL. International Journal of Pediatric Research and Reviews, v. 19, p. x-x, 2019.

Apresentações de trabalhos

1. Oliveira, J.M.F.; **BATISTA, J. V. G. F.**; ARCANJO, G. S.; HATZLHOFER, B. L. D.; MARTINS, D. A. P.; DOMINGOS, I. F.; RAFAEL, A. B. L. M.; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO SNPRS1478605 (A>G) DO GENE THBS1 COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. ARCANJO, G. S.; **BATISTA, J. V. G. F.**; Oliveira, J.M.F.; DOMINGOS, I. F ; ARAUJO, A. B. S. ; ANDRADE, A. M. G. ;ANJOS, A. C. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENEPOLYMORPHISMS AND SICKLE CELL ANEMIA SEVERITY. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. SILVA, C. I. N.; RAFAEL, A. B. L. M.; AGUIAR, A. M. G.; SILVA, D.M.L ; **BATISTA, J. V. G. F.**; LIMA, M. B. P. L. V. ;COSTA, I.M. ; BEZERRA, M. A. C. ; HATZLHOFER, B. L. D. . A importância dos cuidados pré-analíticos no diagnóstico e

classificação de pacientes com Hemofilia A. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. **BATISTA, J. V. G. F.**; ARCANJO, G. S.; Oliveira, J.M.F. ; SILVA, D. M. L. ; RAFAEL, A. B. L. M. ; ARAUJO, A. B. S. ;BANDEIRA, M. L. S. ; AGUIAR, A. M. G. ; ALCÂNTARA, B. V. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Análise da associação da expressão da proteína KL e dos polimorfismos KL rs1207568 e KL rs9536314 com as complicações clínicas da anemia falciforme. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).

5. **BATISTA, J. V. G. F.** O vasto mundo das hemoglobinopatias com foco na anemia falciforme. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

6. VARELA, N. M. T. ; **BATISTA, J. V. G. F.**; CARVALHO, A. M. C. ; NASCIMENTO, F. R. B. D. ; BEZERRA, M. A. C. . ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DA HEMOGLOBINA S EM RECÉM NASCIDOS EM PERNAMBUCO, BRASIL. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

7. **BATISTA, J. V. G. F.** Como as pesquisas auxiliam na promoção em saúde de pacientes com doenças hematológicas. 2018.(Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

8. XAVIER, A.L.; **BATISTA, J. V. G. F.**; MARTINS, D. A. P. ; DOMINGOS, I. F. ; FALCÃO, D. A. ; SA, A. F. ; ANJOS, A. C. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . WRN and BLM RecQ-Helicase genes are hyperexpressed in patients with SCA. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

9. **BATISTA, J. V. G. F.**; Oliveira, J.M.F. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Análise da associação do polimorfismo KL rs9536314 com complicações clínicas da anemia falciforme. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).

10. **BATISTA, J. V. G. F.** . A pesquisa científica na hematologia. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
11. XAVIER, A.L. ; MARTINS, D. A. P. ; **BATISTA, J. V. G. F.**; SILVA, E. N. ; DOMINGOS, I. F. ; FALCÃO, D. A. ; ANJOS, A. C. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Associação do SNP rs6601330 no gene TNKS1 com dados clínicos e laboratoriais de pacientes com anemia falciforme oriundos da Fundação HEMOPE. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. SILVA, E. N. ; ARCANJO, G. S. ; XAVIER, A.L. ; Ramos, CMA ; Sobreira, M. J. V. C. ; **BATISTA, J. V. G. F.**; BATISTA, T. H.C. ; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Caracterização dos haplótipos do cluster beta de pacientes com hemoglobinopatia SC de Pernambuco. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
13. BATISTA, J. V. G. F.; MARTINS, D. A. P. ; DOMINGOS, I. F. ; FALCÃO, D. A. ; Oliveira, J.M.F. ; XAVIER, A.L. ; ANJOS, A. C.; ARAUJO, A. S. ; ARAUJO, A. R. L. ; BEZERRA, M. A. C. . Expressão diferencial de KLOTHO em indivíduos com e sem anemia falciforme. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. 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. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
15. 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. ; 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 COMANEMIA FALCIFORME. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em bancas

1. FRANCA NETO, P. L.; BEZERRA, M. F.; **BATISTA, J. V. G. F.**

Participação em banca de José Bruno Roberto da Silva.

O papel das proteínas PARP1, PARP2 e PARP3 na fisiopatologia e prognóstico da LMA: uma revisão de literatura.

2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

2. BEZERRA, M. F.; **BATISTA, J. V. G. F.**; FRANCA NETO, P. L.

Participação em banca de Lícy Samara da Silva Xavier.

Pesquisa de mutações nos genes IDH1 e IDH2 e avaliação do seu impacto prognóstico da leucemia mieloide aguda.

2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

3. HATZLHOFER, B. L. D.; FERREIRA, A. M. M. S.; **BATISTA, J. V. G. F.**

Participação em banca de Caroliny Izabela Neris daSilva. Análise da fase pré-analítica no diagnóstico da hemofilia A.

2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco.

4. HATZLHOFER, B. L. D.; **BATISTA, J. V. G. F.**; SOUZA FILHO, S. D.

Participação em banca de Débora Barreto de Barros.

Prevalência de hemoglobinopatias em graduandos da Universidade Federal de Pernambuco.

2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco.

5. LIMA, A. S. M.; ARCANJO, G. S.; **BATISTA, J. V. G. F.**

Participação em banca de Vinicius Santos Vilas Boas.

Variação do número de cópias de DNA mitocondrial na fase crônica da Leucemia Mielóide Crônica.

2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

6. LIMA, A. S. M.; ANDRADE, S. B.; **BATISTA, J. V. G. F.**

Participação em banca de Jêsua Jussara Ferreira.

Fenotipagem eritrocitária entre os acadêmicos da Universidade Federal de Pernambuco.

2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco.

7. HATZLHOFFER, B. L. D.; FERREIRA, A. M. M. S.; DOMINGOS, I. F.; **BATISTA, J. V. G. F.**

Participação em banca de Amanda Caroliny Santos de Freitas.

Fatores de risco para o desenvolvimento de inibidores do fator VIII na hemofilia A.

2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco.

8. DOMINGOS, I. F.; **BATISTA, J. V. G. F.**; FRANCA NETO, P. L..

Participação em banca de Camila Mabel de Albuquerque Ramos.

Influência do polimorfismo do gene UGT1A1 na hiperbilirrubinemia e incidência de colelitíase em pacientes com anemia falciforme.

2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

9. DOMINGOS, I. F.; FALCÃO, D. A.; **BATISTA, J. V. G. F..**

Participação em banca de Marcondes José de Vasconcelos Costa Sobreira.

Avaliação da influência do polimorfismo IVS-14-1046 C>T no gene ANXA2 com o desenvolvimento de doppler transcraniano de alto risco em pacientes com anemia falciforme.

2017 - Universidade Federal de Pernambuco.

Participação em eventos

1. X Jornada de Pós Graduação em Genética. ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES EM KLOTHO COM COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DECORRENTES DA ANEMIA FALCIFORME ,. 2020. (Outra).

2. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular -2019. VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SICKLE CELL ANEMIA SEVERITY. 2019. (Congresso).

3. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 201209. AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO SNPRS1478605 (A>G) DO GENE THBS1 COM ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME. 2019. (Congresso).

4. I Encontro de Biociências da UFPE. Análise da associação da expressão da proteína KL e dos polimorfismos KL rs1207568 e KL rs9536314 com as complicações clínicas da anemia falciforme.

2019. (Encontro).

5. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2018. WRN and BLM RecQ-Helicase genes are hyperexpressed in patients with SCA. 2018. (Congresso).
6. Hemoglobalizando. Anemias: Enfoque em Anemia Falciforme. 2018. (Outra).
7. II Curso Introdutório da Liga Acadêmica de Hematologia - LAHEM. A pesquisa científica na hematologia. 2018. (Outra).
8. III Encontro de Biomedicina do Vale do São Francisco e Simpósio de Hematologia - EBVALE. O vasto mundo das hemoglobinopatias com foco na anemia falciforme. 2018. (Simpósio).
9. III EXPOBIOM - Congresso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro. Como as pesquisas auxiliam na promoção da saúde de pacientes com doenças hematológicas. 2018. (Congresso).
10. VIII Jornada de Pós Graduação em Genética. Análise da associação do polimorfismo KL rs9536314 com complicações clínicas da anemia falciforme. 2018. (Outra).
11. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2017. Expressão diferencial de KLOTHO em indivíduos com e sem anemia falciforme. 2017. (Congresso).
12. VII Jornada da pós graduação em Genética da UFPE. 2017. (Outra).

Organização de eventos

1. Membro da comissão organizadora da VII Jornada da Pós Graduação em Genética da UFPE. 2017. (Outro).

Orientações e supervisões concluídas:

1. Francisco Fabiano Holanda Diógenes.

Complicações cardiovasculares na anemia falciforme.

2021.

Monografia.(Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização lato sensu em hematologia clínica e laboratorial) - Universidade Federal de Pernambuco.

2. Gabriela Ramony Lopes.

Principais Complicações Decorrentes da Anemia Falciforme: uma revisão integrativa.

2021.

Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização lato sensu em hematologia clínica e laboratorial) -Universidade Federal de Pernambuco.

3. Luis Antonio Melo Martins.

Alterações Auditivas e Oftalmológicas Em Pacientes Com Doença Falciforme.

2021.

Monografia.(Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização lato sensu em hematologia clínica e laboratorial) - Universidade Federal de Pernambuco.

4. Gabriela Therescowa de Almeida Paiva Campos.

Correlação entre a utilização de anticoncepcionais orais combinados (COCs)e o desenvolvimento de eventos trombóticos.

2021.

Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização lato sensu em hematologia clínica e laboratorial) - Universidade Federal de Pernambuco.

5. Davison Albuquerque Galvão da Costa.

A triagem neonatal para hemoglobinopatias.

2019.

Monografia.(Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização lato sensu em hematologia clínica e laboratorial) - Universidade Federal de Pernambuco.

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Allyson Guilherme de Menezes.

Análise de métodos diagnósticos laboratoriais de anemia falciforme e hemoglobinopatias em neonatos: uma revisão bibliográfica.

2019.

Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

2. Alberto de Lima Xavier.

Análise da expressão relativa de genes do metabolismo telomérico em pacientes com anemia falciforme.

2018.

Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

3. Everton Neri Xavier.

Hemoglobinopatia SC: panorama clínico, laboratorial e análise da influência dos genótipos da talassemia alfa e dos haplótipos do agrupamento de genes da globina beta como moduladores fenotípicos da doença.

2018.

Trabalho

de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.

4. Gabriela da Silva Arcanjo.

Análise da influência de polimorfismos no gene ENOS com o desenvolvimento de doença cerebrovascular em pacientes pediátricos com anemia falciforme.

2017.

Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco.