



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

TALITA DOS SANTOS SENA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS10754558  
DO GENE *NLRP3* NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Recife  
2023

TALITA DOS SANTOS SENA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS10754558  
DO GENE *NLRP3* NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: MSc. Gabriela da Silva Arcanjo  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra.

Recife  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Sena, Talita dos Santos.

Análise da influência do polimorfismo rs10754558 do gene NLRP3 na variabilidade clínica de pacientes pediátricos com anemia falciforme. / Talita dos Santos Sena. - Recife, 2023.

55 p. : il., tab.

Orientador(a): Gabriela da Silva Arcanjo

Coorientador(a): Marcos André Cavalcanti Bezerra

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Complicações clínicas. 2. Anemia falciforme. 3. Inflamassoma. 4. Moduladores genéticos. 5. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Arcanjo, Gabriela da Silva. (Orientação). II. Bezerra, Marcos André Cavalcanti. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

TALITA DOS SANOS SENA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS10754558 DO  
GENE *NLRP3* NA VARIABILIDADE CLÍNICA DE PACIENTES  
PEDIÁTRICOS COM ANEMIA FALCIFORME**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Graduação em Biomedicina da  
Universidade Federal de  
Pernambuco, como pré-requisito à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biomedicina.

Aprovada em: 20/09/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Mestre Gabriela da Silva Arcanjo  
UFPE/ Departamento de Genética e Biologia Molecular

---

Mestre Madi Veiga Diniz  
UFPE/ Hospital das Clínicas

---

Mestre Werbson Lima Guaraná  
UFPE/ Instituto de Imunopatologia Keizo Asami

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Deus, pela oportunidade que me foi concedida, por ter me dado força todos esses anos. Porque dele, por ele e para ele são todas as coisas.

Agradeço a minha orientadora, que esteve presente não somente na construção deste trabalho, mas em boa parte da minha vida acadêmica, sou grata por tudo que aprendi com você Gabi, és incrível em tudo que faz, és inspiração para mim.

Ao meu professor e também co-orientador Marcos André, por todas as oportunidades que me foi dada, por todos os ensinamentos e por despertar em mim tamanha paixão pela hematologia, saiba que tanto o senhor como o professor Antônio Roberto foram essenciais em tudo isto.

A todos que compõe o Núcleo de Hematologia Clínica e Laboratorial, do LABCEN-UFPE.

A Propesqi pelo apoio financeiro fornecido

Aos meus pais, a minha irmã, eu nem tenho palavras suficientes para agradecer por todo sacrifício, dedicação e toda confiança e fé que depositaram em mim. Sem vocês eu não estaria aqui, amo muito vocês.

Ao meu amor, meu companheiro, Danilo, você foi e sempre será meu porto seguro, te agradeço por todo o apoio, cuidado, e paciência em todos esses anos, eu te amo para sempre.

Agradeço a minha amiga Roberta, desde sempre foi minha duplinha e companheira em toda essa jornada, roro, saiba que você foi um presente que Deus me deu, ele sabia que eu precisaria de você.

Também quero agradecer a minha amiga Joyce, que sempre esteve ao meu lado nos melhores e piores momentos, obrigada jôjô.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram contribuindo para minha formação acadêmica.

SENA, Talita. **Análise da influência do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* na variabilidade clínica de pacientes pediátricos com anemia falciforme.** 2023. 55. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é considerada a doença hereditária monogênica mais comum no mundo, causada pela homozigose de uma mutação pontual no gene da globina  $\beta$  (HBB), formando uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (HbS). Considerando que pacientes com AF apresentam variabilidade nas manifestações clínicas e que estas não são bem compreendidas, a investigação de marcadores genéticos específicos que possam influenciar na heterogeneidade fenotípica pode ser útil na estratificação de pacientes quanto à terapêutica adequada. Alterações funcionais na regulação transcricional podem acontecer por causa de diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes que codificam as citocinas e os inflamassomas. Por exemplo, alguns SNPs do *NLRP3* levam à produção excessiva de IL-1 $\beta$  que pode causar impacto negativo em diversas doenças. Dessa forma, sabendo que o inflamassoma *NLRP3* tem sido associado ao desencadeamento de quadro inflamatório exacerbado, e que seus níveis estão elevados em pacientes com AF, este trabalho teve por objetivo investigar a associação do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* com os quadros clínicos adversos nos pacientes com AF. Para a coleta dos dados clínicos e laboratoriais foram selecionados 316 pacientes pediátricos com AF acompanhados pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). A extração de DNA genômico foi realizada pela técnica de fenol-clorofórmio modificado, e as genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real através da detecção de SNPs utilizando o sistema TaqMan®. O polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* mostrou-se associado com desenvolvimento do sequestro esplênico agudo (SEA) ( $p=0,003$ ). Pacientes com genótipo CC apresentavam menor frequência de SEA ( $p=0,003$ ; OR: 0,41; IC:95%: 0,22 – 0,74), em comparação aos genótipos CG e GG. Foi analisado que o alelo C do polimorfismo rs10754558 estava associado com menor frequência de desenvolvimento de SEA quando comparado ao alelo G ( $p = 0,0084$ ; OR: 0.59; IC 95%: 0.40 - 0.88). Em relação a incidência cumulativa, pacientes com genótipo CC apresentaram uma menor taxa de desenvolvimento de SEA (14,3%) comparado aos genótipos CG e GG (28,7%). Embora não tenha sido estatisticamente significativa, indivíduos com AF e genótipo CC para o polimorfismo rs10754558 apresentam uma frequência maior de priapismo ( $p=0,065$ ; OR: 2,9). Em conjunto, os dados aqui apresentados, revelam que devido a AF ser uma doença de caráter inflamatório crônico, SNP nos genes que codificam citocinas e inflamassomas, como o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* podem influenciar no curso da gravidade clínica nos pacientes com AF.

**Palavras-chave:** Complicações clínicas. Anemia falciforme. Inflamassoma. Moduladores genéticos. Polimorfismo de nucleotídeo único.

SENA, Talita. **Analysis of the influence of the rs10754558 polymorphism of the *NLRP3* gene on the clinical variability of pediatric patients with sickle cell anemia.** 2023. 55. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is considered the most common monogenic hereditary disease in the world, caused by the homozygosity of a point mutation in the  $\beta$ -globin gene (HBB), forming an abnormal hemoglobin, hemoglobin S (HbS). Considering that patients with SCA present variability in clinical manifestations and that these are not well understood, the investigation of specific genetic markers that may influence phenotypic heterogeneity may be useful in the stratification of patients regarding appropriate therapy. Functional changes in transcriptional regulation can occur because of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding cytokines and inflammasomes. For example, some NLRP3 SNPs lead to excessive production of IL-1 $\beta$  that can negatively impact several diseases. Thus, knowing that the NLRP3 inflammasome has been associated with the triggering of exacerbated inflammatory conditions, and that its levels are elevated in patients with SCA, this study aimed to investigate whether the rs10754558 polymorphism of the *NLRP3* gene could be associated with adverse clinical conditions in patients with SCA. For the collection of clinical and laboratory data, 316 pediatric patients with SCA were selected accompanied by the Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE). Genomic DNA extraction was performed by the modified phenol-chloroform technique, and genotyping was performed by real-time PCR through the detection of SNPs using the TaqMan® system. The rs10754558 polymorphism of the *NLRP3* gene was associated with the development of acute splenic sequestration (ASS) ( $p=0.003$ ). Patients with genotype CC had a lower frequency of ASS ( $p=0.003$ ; OR: 0.41; IC: 95%: 0.22 – 0.74), compared to CG and GG genotypes. It was analyzed that the C allele of the rs10754558 polymorphism was associated with a lower frequency of development of ASS when compared to the G allele ( $p = 0.0084$ ; OR: 0.59; 95% IC: 0.40 - 0.88). Regarding the cumulative incidence, patients with genotype CC had a lower rate of development of ASS (14.3%), compared to patients with CG and GG genotypes (28,7%). Although it was not statistically significant, individuals with SCA and genotype CC for the rs10754558 polymorphism have a higher frequency of priapism ( $p=0.065$ ; OR: 2.9). Together, the data presented here reveal that because SCA is a chronic inflammatory disease, SNP in the genes encoding cytokines and inflammasomes, such as the rs10754558 polymorphism of the *NLRP3* gene, may influence the course of clinical severity in patients with SCA.

**Key words:** Clinical complications. Sickle cell anemia. Inflammasome. Genetic modules. Single nucleotide polymorphism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Alterações genéticas em Anemia Falciforme	16
<b>Figura 2</b> – Fisiopatologia da Anemia Falciforme	18
<b>Figura 3</b> – Complicações clínicas da Anemia Falciforme	20
<b>Figura 4</b> – Múltiplos mecanismos de ação da hidroxiuréia na AF	23
<b>Figura 5</b> – Estrutura do inflamassoma NLRP3	27
<b>Figura 6</b> – Ativação do inflamassoma NLRP3	28
<b>Figura 7</b> – Estrutura genética do gene <i>NLRP3</i>	30
<b>Figura 8</b> – Incidência cumulativa de sequestro esplênico agudo (SEA) em pacientes com AF de acordo com modelo dominante para o polimorfismo rs10754558 do gene <i>NLRP3</i>	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Proporção de nascidos vivos com DF em alguns estados do Brasil	17
<b>Tabela 2</b> – Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo	37
<b>Tabela 3</b> – Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo	38
<b>Tabela 4</b> – Frequências alélicas e genotípicas do SNP estudado na população	39
<b>Tabela 5</b> – Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo rs10754558, de acordo com o modelo de herança dominante	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\beta^S$  - Cadeia globínica beta com alteração para a formação da Hb S

AF - Anemia Falciforme

ARB - Árabe-Indiano

AVC - Acidente vascular cerebral

BEM - Benin

BI - Bilirrubina indireta

BT - Bilirrubina total

CAR - República Central Africana

CVO - Crise vaso-oclusiva

DAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Perigo

DF - Doença falciforme

DTC - Doppler transcraniano

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

Hb - Hemoglobina

Hb A - Hemoglobina A

Hb AS - Indivíduo traço falciforme

HbC - Hemoglobina C

HbD - Hemoglobina D

Hb F - Hemoglobina Fetal

Hb S - Hemoglobina S

Hb S/ $\beta^0$  - S/ $\beta^0$  talassemia

HBB - Gene da  $\beta$  globina

HCM - Hemoglobina corpuscular media

Ht – hematócrito

HU - Hidroxiuréia

IL - Interleucina

LabCen - Laboratório Central

LDH - Lactato desidrogenase

Mrna - RNA mensageiro

NF- $\kappa$ B - Do inglês, *factor nuclear kappa B*

NLR - Receptores tipo NOD

NLRP3 - Receptor tipo NOD relacionado a proteína 3 do inflamassoma

NO - Óxido Nítrico

PAMPs - Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PRRs - Receptores de Reconhecimento de Padrões Moleculares

RBC - Do inglês, *Red blood cells*

ROS - Do inglês, *Reactive oxygen species*

SEA - Sequestro esplênico agudo

SEM - Senegal

SNP - do inglês, *Single nucleotide polymorphism*

STA - Síndrome torácica aguda

TLR - Receptores Tipo Toll

TLR4 - Do inglês, *Toll like receptor 4*

VMMF – Velocidade máxima de fluxo

VWF – Do inglês, *von Willebrand factor*

WBC – Do inglês, *White blood cells*

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
2.1	ANEMIA FALCIFORME	15
2.1.1	Etiologia e Epidemiologia	15
2.1.2	Fisiopatologia	17
2.1.3	Complicações Clínicas	19
2.1.4	Tratamento	22
2.1.5	Moduladores Genéticos	24
2.2	INFLAMASSOMA	25
2.2.1	Visão Geral	25
2.2.2	Inflamassoma NLRP3	26
2.3	GENE <i>NLRP3</i> E O POLIMORFISMO rs10754558	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>33</b>
4.1	DESENHO DO ESTUDO	33
4.2	DEFINIÇÃO DOS GRUPOS	33
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	34
4.4	ANÁLISE MOLECULAR	34
4.4.1	Extração de DNA Genômico	34
4.4.2	Genotipagem do Polimorfismo	35
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA COORTE	37
5.2	GENOTIPAGEM DO SNP DO GENE <i>NLRP3</i>	39
5.3	ASSOCIAÇÃO DO SNP DO GENE <i>NLRP3</i> COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA AF	39
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>

<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO A – CÓPIA DO PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é considerada a doença hereditária monogênica mais comum no mundo, onde aproximadamente 20 a 25 milhões de pessoas apresentam a mutação responsável pela doença (AKINGBOLA et al., 2014). Esta condição é causada pela homozigose de uma mutação pontual no gene da globina  $\beta$  (HBB), formando uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (HbS) (STEINBERG, 2008). Sob condições de hipóxia, a HbS se organiza na forma de polímeros e precipita, causando alterações morfológicas na hemácia, resultando, por fim, na falcização da mesma (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Hemácias falcizadas apresentam mais moléculas de adesão, logo, a interação destas com o endotélio vascular, leva à produção de radicais de oxigênio pelas células endoteliais, além da ativação de fatores de transcrição que regulam a síntese de moléculas de adesão (BOZZA; JENEY, 2020). Este panorama produz um quadro pró-inflamatório, com ativação de leucócitos e plaquetas circulantes e aumento de citocinas pró-inflamatórias, culminando, por fim, em episódios de vaso-oclusão, seguido por isquemia e infarto em vários tecidos (CONRAN; BELCHER, 2018). A ocorrência desses eventos, juntamente com a hemólise, compõe um conjunto de fatores fisiopatológicos determinantes da grande maioria dos sinais e sintomas presentes nos pacientes com AF (KATO et al., 2018).

A hemólise crônica, característica da doença, promove a liberação constante de hemoglobina livre que é oxidada liberando o heme, um importante padrão molecular associado a danos (DAMP, do inglês *Damage-associated molecular patterns*) (BOZZA; JENEY, 2020). O heme promove a formação de espécies reativas de oxigênio, ativação do receptor Toll-like 4, geração de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) e liberação de mais DAMPs derivados de tecidos ou células (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). O heme livre pode contribuir para a inflamação estéril, ativando o inflamassoma nas células vasculares e inflamatórias com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias (NYAKUNDI et al., 2019). Dessa forma, a inflamação estéril promove ainda mais a vaso-oclusão por meio da ativação contínua da adesão de neutrófilos, plaquetas e células endoteliais (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

Os inflamassomas, complexos proteicos citosólicos, levam à ativação de respostas

inflamatórias e imunológicas. Existem vários inflamassomas descritos na literatura, como o NLRP3, NLRP1, AIM2 e NLRC4. O inflamassoma NLRP3 é o complexo multimérico mais estudado, a sua ativação leva o processamento e liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 ativadas (ABDERRAZAK et al., 2015). IL-1 $\beta$  liberada promove uma cascata de eventos que leva à ativação de neutrófilos, de plaquetas, da regulação positiva de moléculas de adesão, e quimiocinas como IL-8 nas células endoteliais, as quais promovem a oclusão de vasos. A IL-18 é uma citocina pleiotrópica relacionada à defesa imune inata, com capacidade de induzir a inflamação aguda e promover o recrutamento de neutrófilos (FRANCHI et al., 2009). Foi apontado que o heme livre e hemoglobina livre oxidada promovem fortemente ativação do NLRP3, dessa forma, tendo em vista o processo de hemólise crônica, é provável que na AF a ativação de NLRP3 esteja aumentada (NYAKUNDI et al., 2019). De fato, evidências apontam que os níveis de NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18 estão significativamente elevados em pacientes com AF, em comparação com indivíduos controles saudáveis, sugerindo papel do inflamassoma na fisiopatologia da doença (PITANGA et al., 2016).

Tendo em vista a heterogeneidade clínica, percebe-se a relevância da investigação de marcadores genéticos específicos que possam predizer a susceptibilidade de indivíduos portadores de AF quanto ao risco de desenvolvimento de complicações clínicas graves relacionadas à doença. Genes envolvidos na regulação das vias de inflamação, metabolismo do óxido nítrico, adesão celular e hemostasia podem modular o curso clínico de indivíduos com AF e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês Single Nucleotide Polymorphism) em alguns desses genes têm sido associados a subfenótipos da doença (DRISS et al., 2009).

Dessa forma, considerando o papel do inflamassoma NLRP3 no desencadeamento de quadro inflamatório exacerbado, que contribui para a fisiopatologia da doença, a investigação de polimorfismos no gene *NLRP3* torna-se relevante a fim de identificar possíveis marcadores prognósticos, além de fornecer novos dados sobre a patogênese desta doença.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ANEMIA FALCIFORME

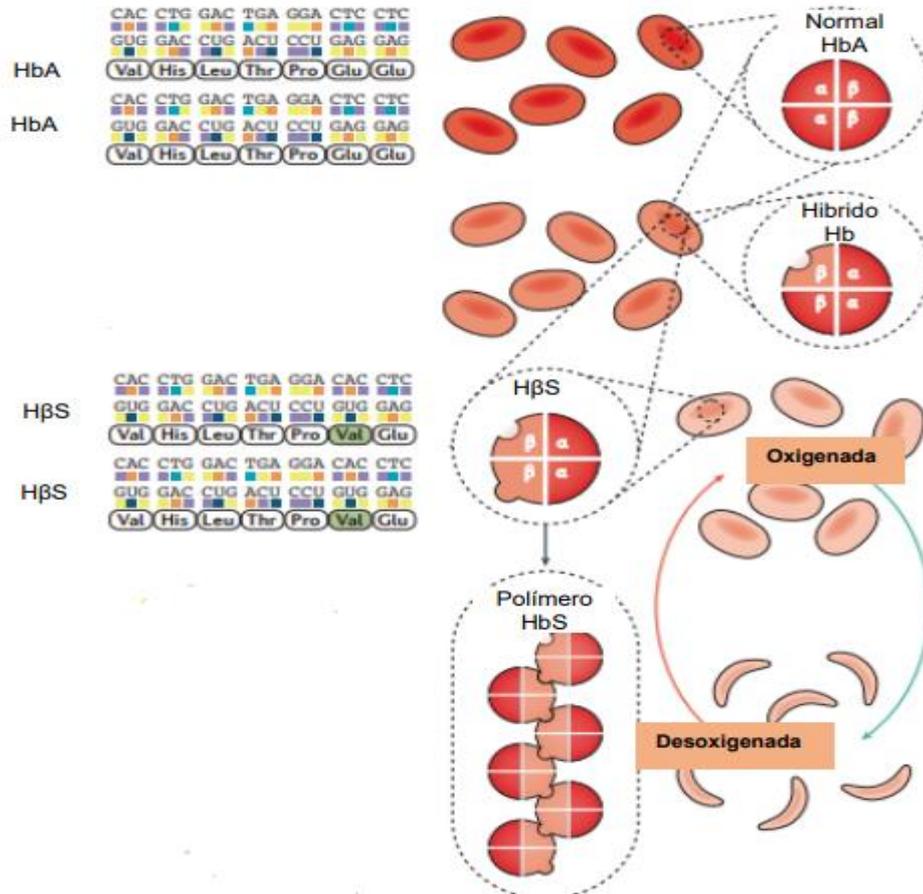
#### 2.1.1 Etiologia e Epidemiologia

O primeiro caso de anemia falciforme (AF) descrito na literatura médica foi em 1910, em um jovem negro que apresentava em seu esfregaço hemácias alongadas e com formato de foice (HERRICK; JAMES, 1910). Após a publicação deste artigo, outros similares também foram relatados, e dessa forma, as primeiras descrições clínicas e patológicas começaram a ser elucidadas, o que proporcionou a diferenciação da hemoglobina S (Hb S) e hemoglobina A (Hb A) por meio da descoberta do padrão de migração eletroforético diferenciado por Linus Pauling em 1949 (PAULING et al., 1949).

A hemoglobina S é conhecida por ser uma variante estrutural da hemoglobina normal presente no adulto, a Hb A. Essa alteração patológica, ocorre devido a uma mutação pontual do códon GAG da sexta posição do gene da cadeia beta (*HBB*), no braço curto do cromossomo 11, onde há a troca de uma adenina por uma timina, ocasionando a síntese de uma valina no lugar do ácido glutâmico na cadeia polipeptídica. Devido a essas alterações a Hb, S apresenta diferentes propriedades físico-químicas em comparação à hemoglobina normal (figura 1) (GALIZA; PITOMBEIRA, 2003; STEINBERG et al., 1995).

A doença falciforme (DF) é definida como um transtorno genético causado quando pelo menos uma das hemoglobinas mutantes é a Hb S. O traço falciforme (Hb AS) se faz presente quando a Hb S está combinada em heterozigose com a Hb A, enquanto a homozigose da Hb S (Hb SS) caracteriza a AF. Há também outras formas de heterozigose mista da Hb S associada com hemoglobinas variantes como a Hb C e a Hb D, e, também, com a beta talassemia (Hb S/ $\beta^+$  talassemia e Hb S/ $\beta^0$  talassemia), cuja sintomatologia se apresenta de forma variável (STEINBERG, 2008).

Figura 1 – Alterações genéticas na Anemia Falciforme. A hemoglobina S é originada devido a uma mutação na posição 6 na cadeia  $\beta$ -globina que ocasiona a substituição de uma adenina por uma timina, e resulta na síntese de uma valina no lugar do ácido glutâmico. Em baixas concentrações de oxigênio, as hemácias HbSS adquirem um formato de “foice” sendo as principais responsáveis pela grande maioria das complicações clínicas da patologia.



Fonte: Adaptada de Kato et al., 2018.

Estima-se que cerca de 300.000 indivíduos nascem com AF por ano no mundo todo. A prevalência da AF é consideravelmente alta em regiões da África, do Oriente Médio, do Mediterrâneo e da Índia, isto porque indivíduos heterozigotos (Hb AS), possuem maior resistência contra infecção pelo *Plasmodium falciparum* causador da malária, e desenvolvem a forma mais branda da doença, permitindo a sobrevivência de um maior número de indivíduos (PIEL et al., 2010). Nas américas a doença chegou devido ao comércio de escravos e logo dispersou-se pela miscigenação que favoreceu a distribuição do alelo  $\beta^s$  (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

No Brasil, a incidência é de 60 mil pessoas com DF, com prevalência do alelo  $\beta^s$  variando entre 1,2% a 11% dependendo do estado. No estado da Bahia é observada uma

maior prevalência, enquanto que em Pernambuco 1 em cada 1.400 nascidos vivos apresentam AF (Tabela 1) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Tabela 1. Proporção de nascidos vivos com DF em alguns estados do Brasil.

DOENÇA FALCIFORME	
Estados	Proporção de Nascidos Vivos/Ano
Bahia	1: 650
Rio de Janeiro	1: 1.300
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1: 1.400
São Paulo	1: 4.000
Mato Grosso do Sul	1: 5.850
Rio Grande do Sul	1: 11.000

Fonte: Adaptado Ministério da Saúde

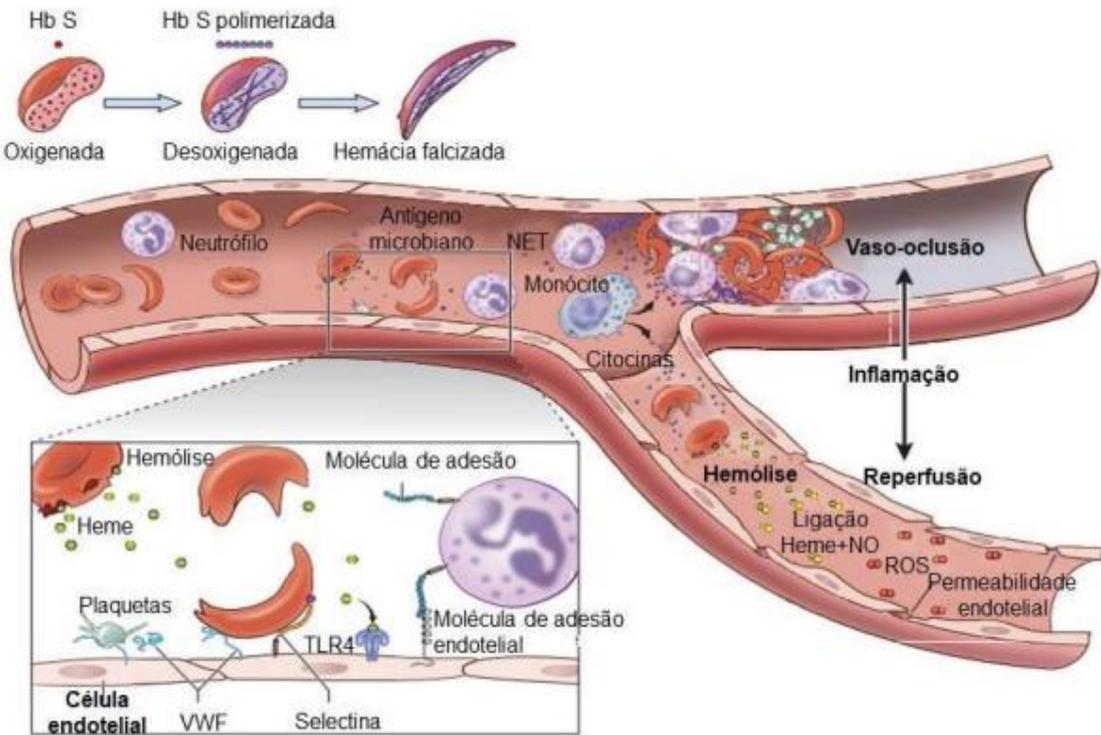
### 2.1.2 Fisiopatologia

No processo de desoxigenação, ou seja, quando a hemoglobina não está ligada ao oxigênio, a Hb S sofre deformações estruturais, causadas por interações de natureza hidrofóbica entre as cadeias globínicas. Essas interações intermoleculares levam à formação de polímeros de Hb, que irão resultar em fibras rígidas e longas, alterando a morfologia das hemácias tornando-as falcizadas (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). Essas hemácias falcizadas possuem maior aderência ao endotélio vascular em comparação às hemácias normais, e esse evento é um dos mecanismos iniciais que desencadeia a fisiopatologia da doença (STEINBERG, 2008). Quando a hemácia perde sua forma original bicôncava apresentando um formato de “foice”, ela se torna mais rígida e perde a flexibilidade ao passar pelos capilares, favorecendo a vaso-oclusão e resultando em eventos hemolíticos (Figura 2) (STYPULKOWSKI; MANFREDINI, 2010).

A AF apresenta maiores níveis de Hb S dentro das hemácias, comparada ao traço falciforme, o que explica o motivo dessa condição ser considerada a mais grave, isto porque a polimerização da Hb S está relacionada exponencialmente com a concentração dessa hemoglobina (KATO et al., 2018). Além do grau de porcentagem da Hb S, outros

fatores como o grau de desidratação celular, o pH, a concentração de Hb Fetal (Hb F), a temperatura, entre outros, influenciam a polimerização da hemácia (STEINBERG, 2008). Devido à deformação das hemácias por causa da polimerização, estas são retiradas da circulação sanguínea prematuramente por meio do sistema fagocitário e por causa dessa destruição eritrocitária precoce ocorre uma importante característica clínica relacionada a doença, a anemia hemolítica. Outros achados laboratoriais presentes na AF estão associados com as reduções dos valores de hemoglobina e hematócrito, e o aumento de reticulócitos, liberados pela medula óssea em resposta à hemólise precoce (ZAGO; PINTO, 2007).

Figura 2: Fisiopatologia da Anemia Falciforme. A polimerização da desoxi-HbS leva à formação de eritrócitos desidratados e deformados. As células falcizadas desencadeiam a oclusão microvascular por meio de interações com neutrófilos e plaquetas ativadas, o que leva à isquemia, hipóxia tecidual, e a vasodilatação. Devido à hemólise há liberação de hemoglobina e oxidação pelo 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. HbS, hemoglobina S; NET, armadilha extracelular de neutrófilos; NO, óxido nítrico; ROS, espécies reativas de oxigênio; VWF, fator von Willebrand; TLR4, receptor do tipo Toll 4.



Fonte: Adaptado de Williams and Thein 2018.

A falcização das hemácias resulta em consequências clínicas que são influenciadas

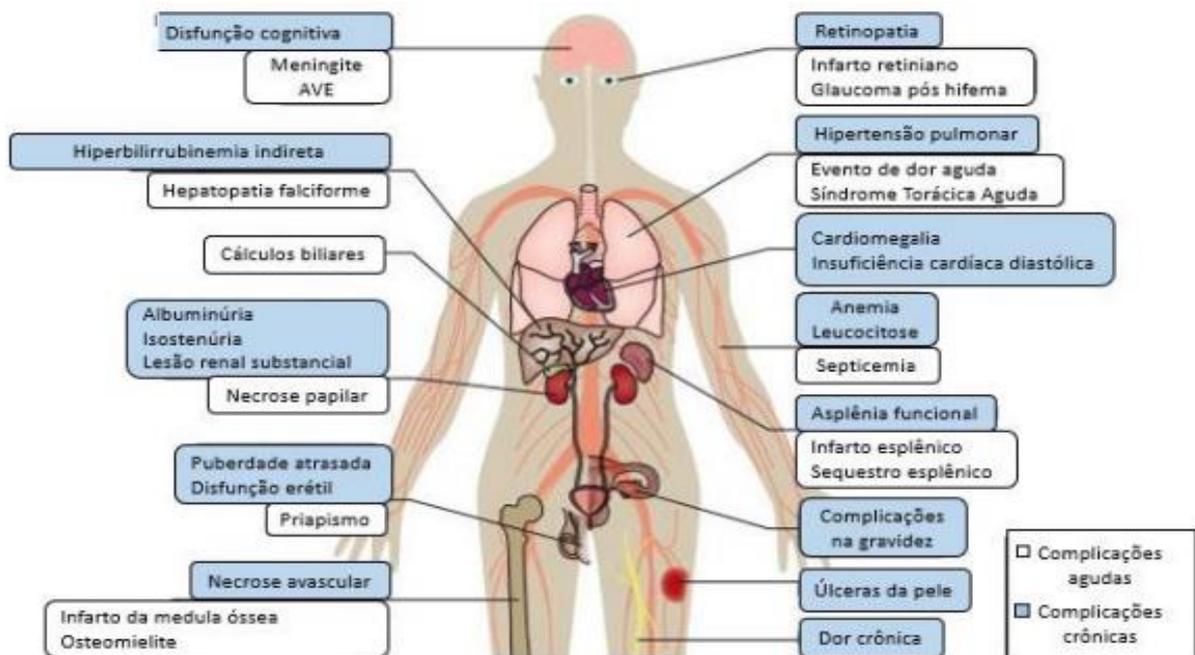
por processos inflamatórios devido ao aumento da adesão das hemácias no endotélio. As moléculas inflamatórias liberadas, como as citocinas interleucina-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), IL-8, IL-6, e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), desencadeiam processos inflamatórios crônicos presentes na AF (CONRAN; BELCHER, 2018). Outras alterações clínicas causadas pela interação da hemácia falcizada com o endotélio vascular, são as lesões microvasculares e a depleção de óxido nítrico (NO), assim como, a obstrução e hipóxia local que por conseguinte agrava a falcização das hemácias (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019; ZAGO; PINTO, 2007).

O desencadeamento de fenômenos inflamatórios está atrelado também aos granulócitos e às plaquetas. Uma maior quantidade de leucócitos é liberada no sangue devido à inflamação e por meio de proteínas de adesão, como a CD47 (expressa pelas hemácias falcizadas), há intensificação dos episódios de vaso-oclusão (DARBARI; SHEEHAN; BALLAS, 2020). As plaquetas ativadas, principalmente por causa dos níveis diminuídos de NO, expressam e liberam P-selectina, que favorece a adesão leucocitária, culminando em uma produção excessiva de trombina e maior ativação da coagulação, por isso, pacientes com AF possuem maior risco de desenvolverem tromboembolismo (BISWAL et al., 2019; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

### 2.1.3 Complicações Clínicas

Pacientes com AF possuem uma grande variabilidade nas manifestações clínicas, com diferentes níveis de complexidade; desde os assintomáticos quanto aqueles que estão sujeitos a várias complicações agudas ou crônicas (Figura 3). Algumas complicações são mais frequentes na faixa pediátrica (sequestro esplênico agudo, dactilite, acidente vascular cerebral) e outras mais frequentes na faixa adulta (úlceras maleolares e osteonecrose). Ainda há algumas que podem ocorrer ao longo de toda vida, como o priapismo, síndrome torácica aguda e as crises vaso-oclusivas. (KATO et al., 2018).

Figura 3: Complicações clínicas da Anemia Falciforme. A dor é a complicação aguda mais comum no paciente com anemia falciforme. As complicações crônicas apresentam disfunções orgânicas que podem evoluir para a morte.



Fonte: Adaptada de Kato et al., 2018.

A crise vaso-oclusiva (CVO), é a complicação clínica mais comum e precoce, responsável pela maioria das admissões hospitalares dos pacientes com AF. Causadas pela obstrução da microcirculação devido a falcização das hemácias, as oclusões resultam em isquemia e hipóxia, levando ao dano vascular e a um quadro de dor intensa (DARBARI; SHEEHAN; BALLAS, 2020). A CVO também pode ocorrer de forma precoce em crianças, denominada dactilite ou “síndrome de mão-pé”, essa condição atinge pequenos ossos das mãos e dos pés, causando edema, eritema e aumento da temperatura local (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

No pulmão, ocorre a segunda causa responsável por internações hospitalares, a síndrome torácica aguda (STA), caracterizada por ser uma complicação aguda que pode ser acompanhada, simultaneamente, por febre, dispneia, dor torácica, tosse, e um novo infiltrado pulmonar evidenciado pela radiografia de tórax (JAIN; BAKSHI; KRISHNAMURTI, 2017). Pacientes com STA necessitam de tratamento hospitalar, devido à alta complexidade da complicação e seu caráter multifatorial. Na etiologia da complicação estão envolvidos fatores como a oclusão vascular pulmonar, embolia gordurosa pulmonar e infecções causadas na maioria das vezes pela *S. Pneumoniae*, *S.*

Aureus, H. Influenzae, Klebsiela, assim como, outros agentes virais (SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019). A STA está intimamente associada com as altas taxas de mortalidade em pacientes com AF, sendo mais frequente em crianças, porém, de maior gravidade nos adultos (MOREIRA, 2007).

Outra complicação frequente é o sequestro esplênico agudo (SEA), que é caracterizado pela retenção de hemácias no baço, com conseqüente aumento do órgão e diminuição dos níveis de hemoglobina e contagem de reticulócitos normal. É geralmente a primeira complicação clínica a se manifestar na infância, com maior incidência entre os 3 meses e 5 anos de vida (EMOND et al., 1985). O aprisionamento das hemácias ocorre devido à falcização e vaso-oclusão nos sinusóides esplênicos, de modo que há diminuição do volume do sangue. Quando não é realizada a transfusão sanguínea, pode ocorrer choque hipovolêmico, condição esta que pode evoluir rapidamente para morte. Os pacientes acometidos pelo SEA apresentam dor abdominal intensa, sede, letargia, uma acentuada palidez, taquicardia e taquipneia. O tratamento consiste na transfusão sanguínea, e em alguns casos, como em pacientes com recorrentes crises, a esplenectomia pode ser uma opção (BALLAS et al., 2010).

Uma das mais graves complicações da AF é o acidente vascular cerebral (AVC), sendo frequente nas primeiras décadas de vida, podendo ser isquêmico ou hemorrágico. Os pacientes acometidos, possuem como sinais e sintomas as convulsões, confusão mental, cefaleia intensa, e deficiências neurológicas (WONG; POWARS, 2007). O AVC isquêmico apresenta risco mais elevado na primeira década de vida, acontece em aproximadamente 11% dos indivíduos com AF até os 20 anos, com incidência de 1 a 2%/ano entre os dois e cinco anos de idade. Em relação ao AVC hemorrágico a prevalência é menor nas crianças, aproximadamente 3% dos casos, e mais comum em adultos por causa dos aneurismas arteriais e a síndrome de Moya-Moya. A transfusão de eritrócitos é considerada uma medida utilizada como tratamento (BREWIN; KAYA; CHAKRAVORTY, 2017).

A doença cerebrovascular, se define desde o Doppler transcraniano de alto risco até a condição mais grave, o acidente vascular cerebral, que resulta em aproximadamente 20% da mortalidade em indivíduos com AF. O AVC se caracteriza como uma complicação neurológica aguda, devido a oclusões de artérias cerebrais e conseqüente isquemia tecidual, resultado do fenômeno de falcização das hemácias (ADAMS, 2014). Crianças com AF possuem um risco cerca de 300 vezes maior de desenvolver o AVC quando

comparadas com crianças sem AF, isto relaciona a AF como a causa mais comum de AVC nos primeiros anos de vida (HOPPE, 2005). A identificação de pacientes com maiores risco de desenvolverem o AVC pode ser realizada por meio do Doppler Transcraniano (DTC), uma ferramenta de triagem que serve para estratificar e prevenir o acometimento dessa complicação clínica em crianças com AF e S/ $\beta^0$  talassemia (ADAMS et al., 1998).

Pacientes que realizam o DTC podem ser classificados em três grupos: normal; condicionante e de alto risco, tendo como referência a média da velocidade máxima de fluxo (VMMF). Nos pacientes com AF a VMMF é dita normal até 170 cm/s, em relação ao grupo condicionante o valor estimado da VMMF é igual ou superior a 170 cm/s até 199 cm/s, e alto risco quando esse valor é igual ou superior a 200 cm/s em duas avaliações seguidas feitas independentemente (ADAMS, 2014; RANKINE-MULLINGS et al., 2018). As crianças com AF associada a um DTC de alto risco, tendem a manifestar um risco maior (44 vezes) de desenvolver AVC quando comparadas aquelas com AF mas, com DTC normal (ADAMS et al., 1992).

O priapismo consiste na ereção peniana persistente e dolorosa, que ocorre sem relação a desejo ou estímulo sexual. Esta patologia pode ser intermitente, ou de forma prolongada, e quando se prolonga por mais de 4 horas pode levar a fibrose e impotência, e além disso, pode ser acompanhado por episódios de gagueira (LOTTENBERG; HASSELL, 2005). O priapismo nos pacientes com AF, está associado com as interrupções na via de transdução do sinal do óxido nítrico (NO), molécula relacionada na regulação e fisiopatologia dessa complicação clínica, por participar da sinalização nas vias que medeiam a ereção, neste caso, a hemólise diminui a disponibilidade de óxido nítrico circulante (CINTHO OZAHATA et al., 2019). Na AF pode acontecer em até 89% dos pacientes do sexo masculino, sendo manifestada até os 20 anos de idade (ANELE et al., 2015).

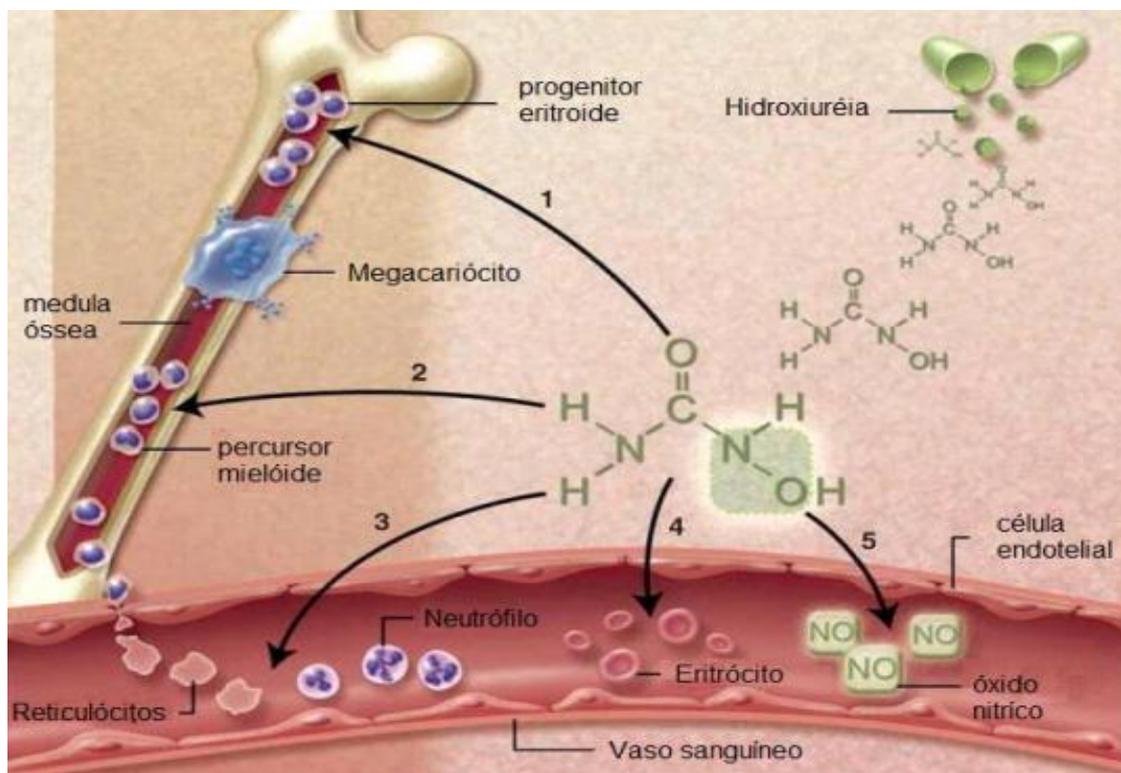
Por fim, outras complicações como colelitíase, cardiopatias, necrose assépticas de cabeça de fêmur e úlceras de membros inferiores, podem acometer pacientes com AF, mesmo que sejam relatadas com uma menor frequência (KATO et al., 2018; STEINBERG, 2008).

#### 2.1.4 Tratamento

Na AF existe cerca de três tipos de tratamentos que visam melhorar e amenizar

os sinais e sintomas clínicos da doença. A Hidroxiuréia (HU) é um composto químico no qual apresenta significativa melhora de vida nos pacientes com AF, isto deve ao fato da HU atuar na diminuição do número de crises vaso-oclusivas, ocorrência de STA e consequente redução dos episódios de hospitalização (PLATT et al., 1994). Os benefícios da HU para a AF estão relacionados com o seu mecanismo de ação, que está associado com a capacidade de estimular o aumento de HbF, e, conseqüentemente, com a inibição da polimerização da HbS, evitando a falcização das hemácias em condições de desoxigenação. Isto ocorre devido ao bloqueio da síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) pela inibição da ribonucleotídeo redutase pela qual mantém as células em fase S do ciclo celular (LEBENSBURGER et al., 2010). Os benefícios da HU proporcionam também diminuição dos neutrófilos e plaquetas, reduzindo, assim, a inflamação crônica, há também a redução da expressão de moléculas de adesão e aumento da síntese do óxido nítrico (NO), o qual está envolvido na dilatação vascular e na indução da produção de HbF (Figura 4) (MCGANN; WARE, 2015).

Figura 4: Múltiplos mecanismos de ação da hidroxiuréia na AF. Os principais benefícios da hidroxiuréia incluem o aumento da liberação do óxido nítrico (NO) com potencial vasodilatação local e melhora da resposta vascular, diminuição da adesividade e indução da síntese de HbF.



Fonte: Adaptada de Ware 2010.

As transfusões sanguíneas são indicadas em situações em que a anemia provoca impactos clínicos nos pacientes, relacionadas principalmente, porque aumentam a concentração de Hb A, tais hemoglobinas apresentam as funções e morfologia normais, e reduzem a concentração de Hb S, dessa forma, contribui para a redução dos impactos hemolíticos da AF (STEINBERG, 2008).

O único tratamento curativo da doença é o transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), cujo intuito é o restabelecimento da hematopoese normal, eliminando todas as consequências das hemácias falcizadas. Porém, dentre as possíveis complicações, pode-se esperar que o receptor desenvolva toxicidade frente a medula recebida (ALI et al., 2020).

#### 2.1.5 Moduladores Genéticos

Embora que a fisiopatologia da AF esteja associada com a polimerização da Hb S, ainda permanece não totalmente compreendida. Apesar de que vários aspectos ainda sejam desconhecidos, fica claro que a etiologia da AF é influenciada por eventos multifatoriais, dessa forma, o entendimento dos mecanismos fenotípicos que levam à variabilidade clínica da doença é sustentado por interações complexas que resultam em um caráter multigênico (PICCIN et al., 2019).

Foi descoberto que a mutação da Hb S se originou em herança com cinco haplótipos do *cluster* da beta globina que se originaram na África, no Oriente Médio e na Índia. Os haplótipos podem ser: Benin (BEN), Bantu ou República Central Africana (BAN ou CAR), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Árabe-Indiano ou Saudi-Árabe (ARB ou SAU). Esses haplótipos da globina  $\beta^s$  estão relacionados com a modulação dos níveis da Hb F que não participa da formação do polímero da Hb S, dessa forma, tem um efeito diluidor na concentração dessa hemoglobina, diminuindo o processo de polimerização. Por isso, ter maiores níveis de Hb F se torna vantajoso em pacientes com AF (SERJEANT; VICHINSKY, 2018). A hemoglobina fetal é um modulador bastante conhecido na AF, o aumento dos seus níveis tem papel importante no quadro da doença, por induzir a diminuição da gravidade das manifestações clínicas, devido a função inibitória que a Hb F exerce no processo da falcização (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

Dessa maneira, os pacientes com AF que apresentam haplótipos Senegal ou Árabe-Indiano possuem níveis aumentados da Hb F, por isso, esses pacientes se

apresentam com uma forma mais branda da doença, em contrapartida, aqueles que possuem haplótipo Bantu apresentam uma forma clínica mais grave, devido aos níveis mais baixos da Hb F (SERJEANT; VICHINSKY, 2018).

Outro modulador genético conhecido, é a co-herança com a alfa talassemia ( $\alpha$ -talassemia), presente em mais de 30% dos pacientes com AF. A  $\alpha$ -talassemia modula a doença diminuindo os níveis intracelulares de Hb S, e dessa forma, atua reduzindo as consequências da polimerização, ocasionando uma menor taxa hemolítica (STEINBERG; SEBASTIANI, 2012). Esse efeito protetor que a  $\alpha$ -talassemia oferece aos pacientes com AF, está relacionado com a discordância da síntese entre as cadeias globínicas  $\alpha$  e  $\beta$  causada pelas deleções da globina  $\alpha$  (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Ademais, outros moduladores que afetam o metabolismo do óxido nítrico, a adesão celular, hemostasia, as vias de inflamação e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) também estão envolvidos nas diferentes expressões fenotípicas presentes na AF (SERJEANT; VICHINSKY, 2018; STEINBERG; SEBASTIANI, 2012).

## 2.2 INFLAMASSOMA

### 2.2.1 Visão Geral

O sistema imune é responsável pelo reconhecimento de componentes próprios e não próprios do corpo, por meio da participação de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os PRRs citoplasmáticos compõe-se por receptores do tipo NOD (NLRs), que são subdivididos em NLRPs e NLRCs, sendo o NLRP3 um dos inflamassomas mais estudados (MEDZHITOV, 2008; SHARMA; KANNEGANTI, 2016).

Os inflamassomas consistem em complexos proteicos citosólicos que controlam a produção de citocinas próinflamatórias como, IL-1 $\beta$  e IL-18, levando à ativação de respostas inflamatórias e imunológicas, por meio de iniciações inflamatórias de morte celular conhecida como piroptose. Existem vários inflamassomas descritos na literatura, como o NLRP3, NLRP1, AIM2 e NLRC4. O inflamassoma NLRP3 reconhece diversas alterações celulares e produz resposta diferente para cada tipo de doença (SHARMA;

KANNEGANTI, 2016). O primeiro inflamassoma a ser descoberto foi o NLRP1 ou NALP1, e logo após a sua identificação, outros complexos similares também foram encontrados: NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 E NLRC4) (MISSIROLI et al., 2021).

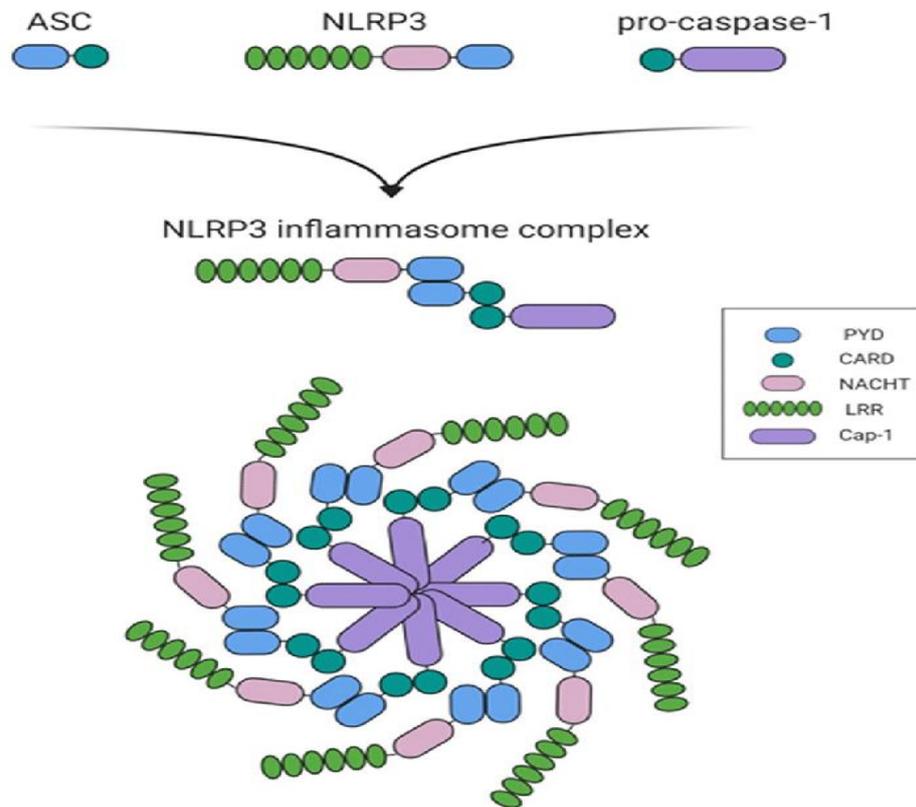
### 2.2.2 Inflamassoma NLRP3

O inflamassoma NLRP3 faz parte do sistema imunológico inato e compreende a molécula sensora NLRP3 (proteína da família NLR contendo um domínio pirina 3), a proteína adaptadora ASC (que contém domínios PYD e CARD) e a pró-caspase-1. O NLRP3 engloba três domínios, sendo um domínio pirina N-terminal (PYD) que através de interações com o domínio pirina de ASC inicia a formação do inflamassoma; há também um domínio central de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NACHT); e um domínio de repetição rica em leucina (LRR), porém estudos mostraram que não influencia na formação do inflamassoma. Portanto, quando ativado, a proteína NLRP3 interage com o ASC via PYD, e o domínio CARD do ASC atrai o domínio CARD da pró-caspase-1 para formar o complexo NLRP3 – ASC – pró-caspase-1, conhecido como inflamassoma NLRP3. Após ser ativado, o NLRP3 é distribuído para membranas associadas a mitocôndrias (MAMs) e as mitocôndrias (Figura 5) (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; MISSIROLI et al., 2021).

A ativação de NLRP3 é regulada por diferentes proteínas como a NEK7 (domínio central de quinase e uma cauda N-terminal curta) um regulador seletivo da ativação do inflamassoma NLRP3, que regula a progressão mitótica e a resposta a danos no DNA (MISSIROLI et al., 2021). A especificidade da interação NEK7-NLRP3 foi sugerida quando comprovado que NEK6 não poderia controlar a ativação do inflamassoma NLRP3 como NEK7. Ademais, estudos mostram que a interação entre NLRP3 e NEK7 ocorre por meio dos domínios NACHT e LRR do NLRP3 (RICHARDS et al., 2009).

A enzima caspase compõe o complexo inflamassoma, e essas enzimas estão associadas no processo de apoptose, necrose, regulação celular e inflamação. A caspase 1 atua na clivagem da pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18, e no final, as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 ativadas são liberadas pelo inflamassoma. Essas citocinas desempenham papel fundamental na formação da imunidade adaptativa, podendo exercer um efeito amplificador nas respostas dos linfócitos B e T (DAVIS; WEN; TING, 2011).

Figura 5: Estrutura do inflamassoma NLRP3. O inflamassoma NLRP3 é formado por uma proteína sensora, uma proteína adaptadora e a proteína efetora. O complexo NLRP3 interage com o ASC via PYD, e o domínio CARD do ASC atrai o domínio CARD da pró-caspase-1 para formar a estrutura final.



Fonte: Adaptado de Seok et., al 2021.

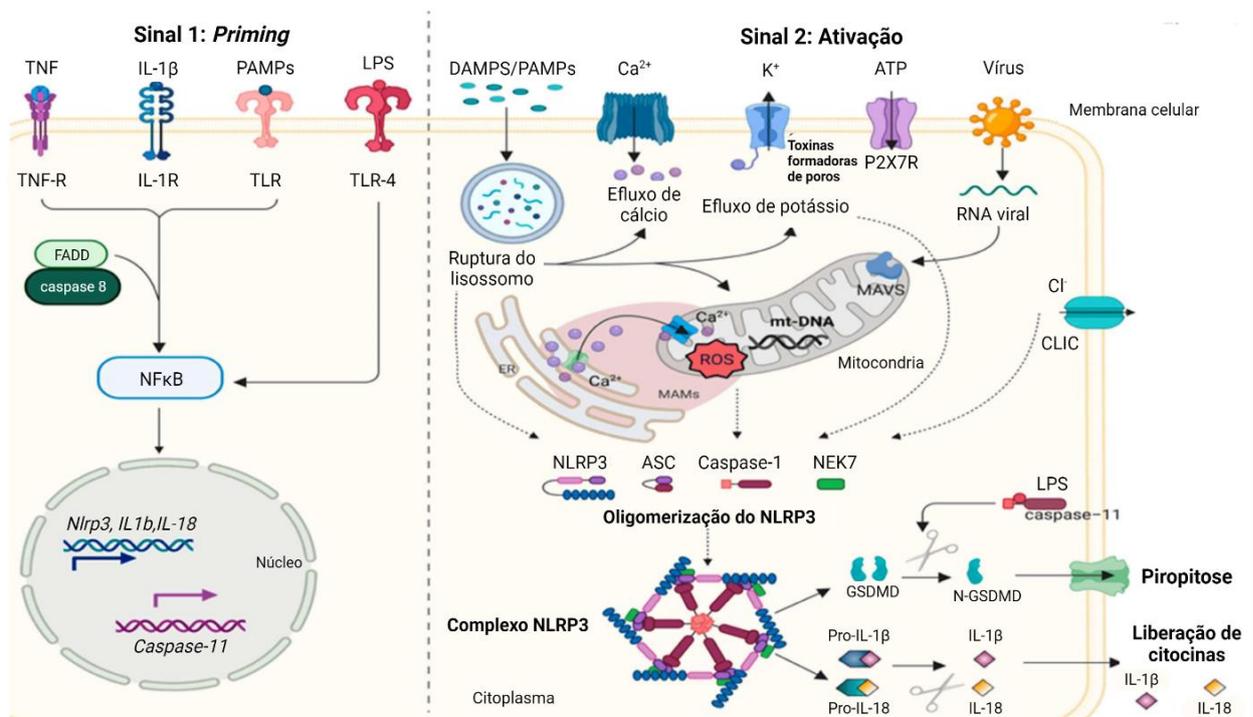
Mesmo sendo o mais conhecido e estudado, o inflamassoma NLRP3 ainda não é bem elucidado em relação a seu mecanismo de ativação. Até então, podemos separá-lo em duas etapas: *priming* e ativação. A primeira fase, *priming*, é iniciada por meio de receptores Toll-like (TLRs) e seus respectivos ligantes, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF) ou IL- $\beta$ , essa interação desencadeia a transcrição de NLRP3 e pró-IL-1 $\beta$  via a regulação do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). A proteína do domínio de morte associada ao FAS (FADD) e a caspase-8 também são responsáveis por induzir a expressão de NLRP3 nessa primeira etapa (MISSIROLI et al., 2018; ZHOU et al., 2011).

Na etapa seguinte, a ativação, é estimulada por diversos ativadores de NLRP3, porém não está totalmente esclarecido como moléculas não relacionadas com o inflamassoma pode ativá-lo. É nessa fase que ocorre a formação do complexo NLRP3 e liberação de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-18). A ativação, é induzida por meio de sinalização celular efetuada pelos ativadores do inflamassoma e captada pelo receptor NLRP3. E como originadores desse sinal, temos, a sinalização de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), efluxo de

potássio (K<sup>+</sup>), efeitos de espécies reativas de oxigênio (ROS), vazamento lisossomal, exposição a DAMPs e a PAMPs, como o lipopolissacarídeo (LPS), e disfunção mitocondrial (KELLEY et al., 2019; SCHRODER et al., 2012).

Ademais, o excesso de Ca<sup>2+</sup> liberado pelo retículo endoplasmático (RE) vai resultar na disfunção mitocondrial e essa ação está diretamente implicada na ativação do inflamassoma NLRP3. Enquanto que o efluxo Cl<sup>-</sup> mediado pela proteína do canal intracelular de cloreto (CLIC)<sup>-</sup> viabiliza a interação NEK7-NLRP3 e posteriormente, promove a formação do inflamassoma NLRP3 (MISSIROLI et al., 2021). O LPS pode ativar diretamente o TLR4 para induzir a transcrição e ativação da caspase-11, e dessa maneira vai atuar na clivagem da proteína gasdermina D formadora de poros (GSDMD), esse mecanismo pode induzir a piroptose. Além disso, a proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) medeia a ativação de NLRP3 induzida por vírus de RNA (figura 6) (KAYAGAKI et al., 2015; MISSIROLI et al., 2021).

Figura 6: Ativação do inflamassoma NLRP3. Para a ativação do inflamassoma NLRP3 se faz necessário dois sinais. O primeiro sinal é mediado pela ativação via TLR, culminando no aumento da transcrição gênica da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. O segundo sinal envolve a oligomerização do NLRP3, o que leva, de fato, a sua ativação e posterior clivagem e liberação das citocinas ativas.



Fonte: Adaptada de Missirolí et al., 2021.

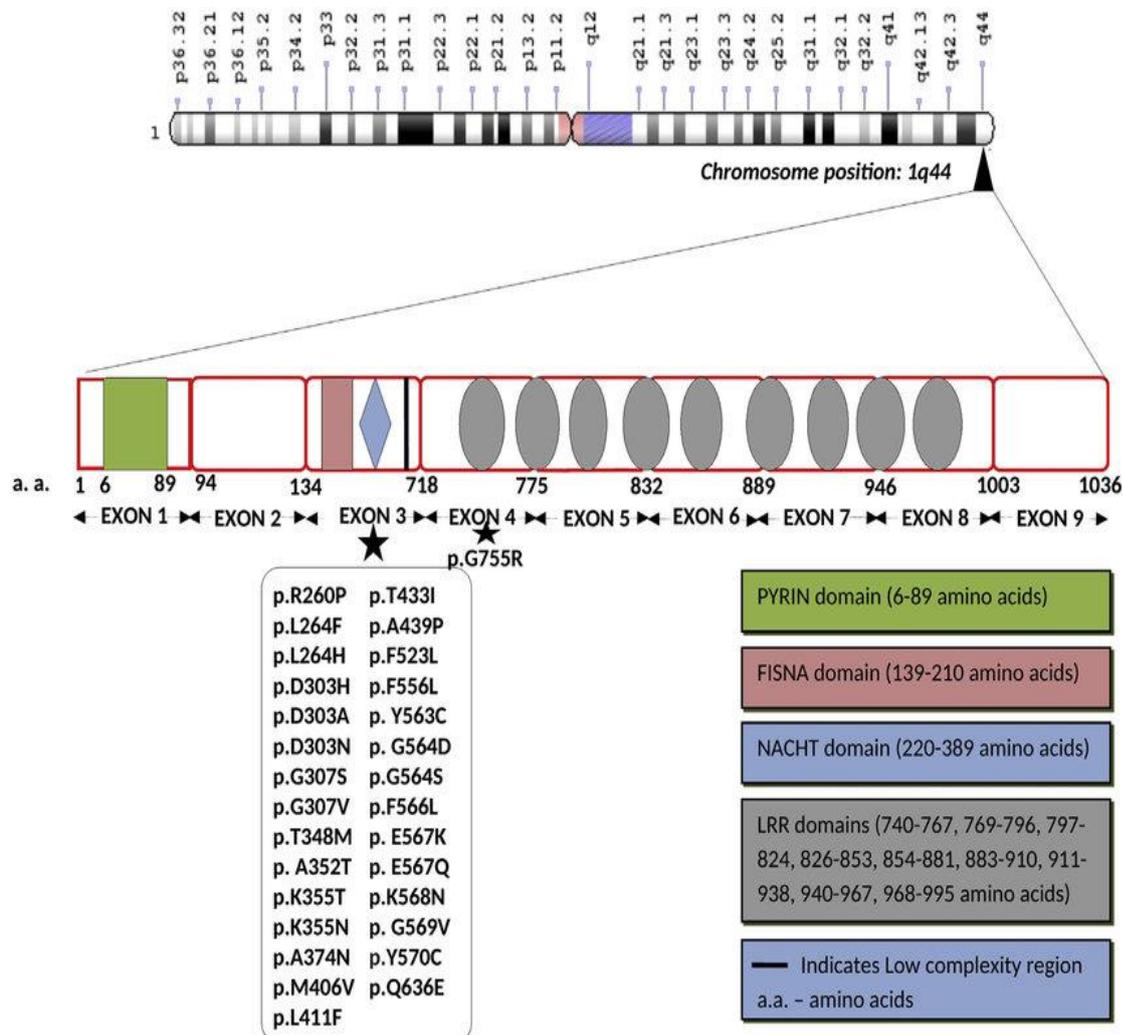
O inflamassoma NLRP3 pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia de doenças inflamatórias, como a AF, contribuindo para a sua gravidade, podendo, também, ser responsável pela falha terapêutica em relação à inflamação (PITANGA et al., 2016). No que se diz respeito à ativação do NLRP3 na AF, o aumento do heme livre no plasma tem sido associado com a ativação do inflamassoma, por uma via capaz de elevar a expressão do NLRP3 por meio da sinalização por NF-KB, a via TLR4. Além da ativação do NF-KB, ocorre também a expressão das moléculas de adesão e a degranulação de corpúsculos de Weibel-Palade, que contem fator de von Willebrand (VWF) e P-selectina, moléculas envolvidas no processo de vaso-oclusão na AF (BELCHER et al., 2014). Além disso, o heme livre atua também na liberação de NETs, responsáveis por aumentar a coagulação intravascular no decorrer do processo inflamatório, esse efeito favorece algumas manifestações clínicas da AF, como a vaso-oclusão e STA (BELCHER et al., 2014).

Os níveis de NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18 estão significativamente elevados em pacientes com AF, quando comparado com indivíduos controles saudáveis, sugerindo o papel do inflamassoma na fisiopatologia da doença (PITANGA et al., 2016).

### 2.3 GENE *NLRP3* E O POLIMORFISMO rs10754558

O gene *NLRP3* responsável pela codificação da proteína NLRP3, tem cerca de 32,9 kb de comprimento e está localizado no cromossomo humano 1q44 e consiste de 9 exóons (figura 7) (VILLANI et al., 2009). Alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene *NLRP3*, estão associados com o aumento da ativação de inflamassomas e com a produção excessiva de IL-1 $\beta$ , devido a alterações em sua função. Entre os 60 SNPs no gene *NLRP3* identificados até o momento, os mais conhecidos são: rs35829419, rs10754558, rs4925648 e rs10925019 (ZHANG et al., 2011).

Figura 7: Estrutura genética do gene *NLRP3*. O gene *NLRP3* tem cerca de 32,9 kb de comprimento, está localizado na posição cromossômica 1q44, e consiste em 9 exóns.



Fonte: Adaptado de Singh et al., 2019.

O polimorfismo rs10754558 (G/C) está localizado na região 3' não traduzida (3'-UTR) do gene *NLRP3* e tem sido relacionado à estabilidade do mRNA de *NLRP3*, e no aumento da atividade potenciadora da expressão de *NLRP3* (ADDOBBATI et al., 2018). Estudos comprovam que esse SNP está associado com várias doenças, principalmente as inflamatórias (PONTILLO et al., 2012). Foi analisado também que o alelo G do rs10754558 está relacionado com o aumento das concentrações séricas de proteína c reativa (PCR) e anticorpos anti-dsDNA e com os níveis mais baixos de C3 e C4 (EHTESHAM et al., 2021). Hitomi e colaboradores mostraram que o rs10754558 está significativamente associado à susceptibilidade à anafilaxia induzida por alimentos

(HITOMI et al., 2009). Enquanto que Ozbayer e colaboradores descobriram a associação do polimorfismo rs10754558 com o risco de desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 (OZBAYER et al., 2022).

Portanto, considerando o papel do inflamassoma NLRP3 no desencadeamento de quadro inflamatório exacerbado, fato que contribui para a fisiopatologia da AF, a investigação de polimorfismos no gene *NLRP3* torna-se importante para a identificação de possíveis marcadores prognósticos, além de fornecer novos dados sobre a patogênese desta doença.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* com o desenvolvimento de complicações clínicas em coorte pediátrica de indivíduos com anemia falciforme acompanhados no serviço de Hematologia e Hemoterapia da Fundação HEMOPE, no estado de Pernambuco.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterizar as manifestações clínicas e laboratoriais dos indivíduos pediátricos com anemia falciforme acompanhados na Fundação HEMOPE;

b) Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* nos pacientes estudados;

c) Relacionar as frequências encontradas do polimorfismo acima descrito com o desenvolvimento de complicações clínicas nos pacientes com anemia falciforme estudados.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo com comparação interna de grupos. O projeto foi desenvolvido no Laboratório Central do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (LABCEN-UFPE). A Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) — Recife foi incluída no projeto como instituição coparticipante, onde foram coletadas as amostras de sangue periférico dos pacientes participantes e realizadas as análises dos prontuários de acompanhamento médico dos mesmos.

### 4.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

A amostra selecionada para o estudo é composta por indivíduos com anemia falciforme entre 03 e 17 anos de idade (recrutados até a data da censura do estudo 01/01/2020), não aparentados, de ambos os sexos, acompanhados pelo ambulatório de Hematologia da Fundação HEMOPE - Pernambuco. Foram analisados os prontuários de 377 pacientes com AF, sendo excluídos do estudo aqueles que apresentaram acompanhamento ambulatorial irregular e/ou perda de seguimento. Os dados clínicos (ocorrência das complicações clínicas) e laboratoriais (hematológicos, bioquímicos e quantificação das hemoglobinas) foram obtidos pela análise dos prontuários médicos dos pacientes. De acordo com as informações colhidas sobre os respectivos cursos clínicos como definido por BALLAS et al., 2010, foi realizada a divisão dos indivíduos em grupos como se segue:

- I. Grupo sequestro esplênico agudo: composto por indivíduos que apresentaram esplenomegalia, acompanhada pela queda nos níveis basais de hemoglobina;
- II. Grupo dactilite: composto por indivíduos que apresentaram relatos de edema em mãos e pés acompanhados de dor e/ou calor local;
- III. Grupo síndrome torácica aguda: Composto por indivíduos que apresentaram registro clínico de síndrome torácica aguda, acompanhada de exame de imagem (Raio-X) de tórax, mostrando a presença de infiltrado pulmonar;

- IV. Grupo priapismo: composto por indivíduos do sexo masculino que apresentaram registro único ou recorrente de priapismo relatado.
- V. Grupo Acidente Vascular Cerebral (AVC): composto por indivíduos que apresentam registro de ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada mostrando lesão neurológica consequente de acidente vascular cerebral (AVC).
- VI. Grupo Doppler Transcraniano: composto por indivíduos que apresentaram registro de realização de Doppler Transcraniano (DTC). De acordo com a velocidade máxima obtida no DTC, os pacientes foram estratificados como se segue: DTC normal (velocidade de fluxo  $< 170$  cm / s), DTC condicional (velocidade de fluxo entre 170-199 cm / s), e DTC alto risco (velocidade de fluxo  $\geq 200$  cm / s). Para as análises neste grupo, pacientes com DTC inadequado (isto é, velocidade de fluxo não detectada pelo exame devido à limitação técnica), e inconclusivo (isto é, resultados de DTC que não puderam ser interpretados), foram excluídos.
- VII. Adicionalmente todos os pacientes foram analisados de acordo com o número de crises vaso-oclusivas (CVOs) que necessitaram de atendimento hospitalar reportadas ao ano:  $< 2$  CVOs/ano, 2 - 5 CVOs/ano e  $> 5$  CVOs/ano).

### 4.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto trata-se de um subprojeto de uma pesquisa aprovada em 05/08/2021 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (CAAE: 49179421.0.0000.5208), de acordo com o previsto na resolução no 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo A). Foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos responsáveis pelos menores envolvidos no projeto (Anexo B).

### 4.4 ANÁLISE MOLECULAR

#### 4.4.1 Extração de DNA Genômico

Cerca de 4,0 mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) foram coletados para realização dos experimentos. As amostras coletadas foram conduzidas ao laboratório de Hematologia e Biologia Molecular do LABCEN-UFPE, onde foram processadas para que as análises moleculares pudessem ser realizadas. A extração de DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos pela técnica de fenol-clorofórmio modificado (Davis et al., 1986).

#### 4.4.2 Genotipagem do Polimorfismo

Para este estudo foi selecionado o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3*. A metodologia empregada para a realização das genotipagens foi a PCR em tempo real através da detecção de SNPs utilizando o sistema TaqMan®. Para a realização dessa técnica foi utilizado o aparelho QuantStudio 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems) disponibilizado no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães – Recife.

As reações foram preparadas em um volume final de 5 µL, utilizando 2,5 µL de Taqman Genotyping Master Mix (Thermofisher, Foster City, EUA), 0,25 µL de sonda Taqman na concentração de 20 vezes (Thermofisher, Foster City, EUA), 1,25 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura e 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL. A ciclagem para os ensaios foi 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínico-laboratoriais dos indivíduos foram apresentadas de forma descritiva. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado usando o teste de Chi-quadrado. Para comparações entre variáveis categóricas, o teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher (quando aplicável) foi utilizado, enquanto que os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para comparações entre as variáveis contínuas. O risco para o desenvolvimento das manifestações foi avaliado a partir da análise das datas de desenvolvimento das complicações, em relação à data de nascimento. Todos os valores de P foram

ajustados para os dois lados com nível de significância a 0,05. As análises foram realizadas utilizando os softwares SPSS Statistics 19.0 (IBM corporation)

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COORTE

Dos prontuários de 377 pacientes com AF analisados, 61 foram excluídos do estudo por apresentarem acompanhamento ambulatorial irregular e/ou perda de seguimento, de modo que 316 indivíduos foram incluídos na análise. Desses pacientes, 158 (50%) eram do sexo feminino e 158 (50%) do sexo masculino. A mediana de idade destes indivíduos foi de 11 anos (variação: 3 – 17 anos). Os dados da caracterização laboratorial da população geral constam na tabela 2. Das complicações clínicas estudadas (SEA, dactilite, STA, AVC e priapismo), a dactilite se apresentou com maior prevalência (32,7%), seguido pelo SEA (22,5%) e STA (6,8%) (Tabela 3).

Tabela 2: Caracterização laboratorial dos pacientes incluídos no estudo.

<b>Variável laboratorial</b>	<b>Mediana</b>	<b>Intervalo</b>
Hb F (%)	10,30	1,1 – 28,5
Contagem de hemácias ( $\times 10^{12}$ células/ $\mu$ L)	2,62	1,66 – 4,98
Hemoglobina (g/dL)	7,65	5,1 – 10,6
Hematócrito (%)	22,80	16 – 33
Volume corpuscular médio (fL)	86,55	61 – 103
Hemoglobina corpuscular média (g/dL)	28,90	19 – 33
Contagem de leucócitos ( $\times 10^6$ /L)	14,0	2,1 – 37,9
Contagem de plaquetas ( $\times 10^9$ /L)	447	114 – 802
Contagem de reticulócitos (%)	10,6	2 – 26
Lactato desidrogenase (U/L)	681	211 – 1762
Bilirrubina total (mg/dL)	1,81	0,65 – 8,92
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,29	0,35 – 8,52

Tabela 3: Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo

<b>Características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo</b>	<b>n (%)</b>
Sexo	
Feminino	158 (50%)
Masculino	158 (50%)
Idade	
Intervalo (anos)	03 – 17
Mediana (anos)	11
Sequestro esplênico	69 (22,5%)
Intervalo de idade (anos)	0,5 – 8,7
Mediana de idade (anos)	2,0
Dactilite	100 (32,7%)
Intervalo de idade (anos)	0,3 – 6,3
Mediana de idade (anos)	1,1
Síndrome torácica aguda	21 (6,8%)
Intervalo de idade (anos)	2,5 – 12,0
Mediana de idade (anos)	5,3
Priapismo	16 (10,5%)
Intervalo de idade (anos)	2,8 – 14,1
Mediana de idade (anos)	8,0
Acidente vascular cerebral	16 (5,2%)
Intervalo de idade (anos)	1,9 – 12,8
Mediana de idade (anos)	5,3
Doppler Transcraniano	445 (82%)
Normal	311 (70%)
Condicionante	93 (21%)
Alto risco	41 (09%)
Crises vaso-oclusivas por ano, no último ano	
< 2	185 (63%)
2 – 5	69 (24%)
> 5	39 (13%)

\*Porcentagem incluindo apenas indivíduos do sexo masculino

## 5.2 GENOTIPAGEM DO SNP DO GENE *NLRP3*

A genotipagem do SNP do gene *NLRP3* foi realizada nos 316 indivíduos. A distribuição genotípica do SNP apresentou-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). As frequências alélicas e genotípicas do referido polimorfismo podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4: Frequências alélicas e genotípicas do SNP estudado na população.

Gene <i>NLRP3</i> SNP	Genótipos	Frequência genotípica (n e %)	Alelos	Frequência alélica (%)
rs10754558	CC	130 (41%)	C	64
	CG	150 (48%)		
	GG	36 (11%)	G	36

## 5.3 ASSOCIAÇÃO DO SNP DO GENE *NLRP3* COM AS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS DA AF

Para as análises de associação foram aplicados os modelos de herança genética recessivo, dominante e codominante. Como pode ser visto na Tabela 5, observamos associação entre o polimorfismo rs10754558 com apenas uma complicação clínica dos pacientes com AF, o SEA ( $p=0,002$ ). Para o polimorfismo rs10754558 ao analisar o genótipo CC versus os genótipos CG e GG, observamos que indivíduos com genótipo CC apresentavam menor frequência de SEA ( $p=0,003$ ; OR: 0,41; IC:95%: 0,22 – 0,74). Com relação aos dados laboratoriais não houve associação com o polimorfismo estudado. (Tabela 5). Apesar de não ter sido estatisticamente significativa, foi analisado que indivíduos com AF e genótipo CC para o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* apresentam uma frequência maior de priapismo ( $p=0,065$ ; OR: 2,9; IC:95%: 0,95 – 8,82). As análises mostraram que os pacientes com genótipo CC possuem uma taxa de 16% para o desenvolvimento do priapismo, enquanto os genótipos CG e GG possuem 6%.

Tabela 5: Comparação dos achados clínico-laboratoriais dos pacientes com AF para o polimorfismo rs10754558.

Características clínicas e laboratoriais	Todos os pacientes N = 316	Genótipo CC Total: N (%)	Genótipo CG+ Genótipo GG Total: N (%)	OR (IC 95%)	p- valor
Hb F (%) mediana	10,3	9,5	10,5		0,229
Intervalo	1,1 – 28,5	3,1 – 19,5	1,1 – 28,5		
RBC (x10 <sup>12</sup> /μL), mediana	2,62	2,58	2,65		0,573
Intervalo	1,66 – 4,98	1,85 – 4,98	1,66 – 4,32		
Hb (g/dL), mediana	7,65	7,5	7,8		0,141
Intervalo	5,1 – 10,6	5,2 – 9,7	5,1 – 10,6		
Ht (%), mediana	22,8	22,65	23,2		0,303
Intervalo	16 – 33	16,0 – 30,0	16,0 – 33,0		
VCM (fL), mediana	86,55	86,60	86,5		0,790
Intervalo	61 – 103	74,0 – 100,0	61,0 – 103,0		
HCM (g/dL), mediana	28,90	28,8	29,40		0,304
Intervalo	19 – 33	21,0 – 33,0	19,0 – 33,0		
WBC (x10 <sup>6</sup> /L), mediana	14	14,8	13,9		0,447
Intervalo	2,1 – 37,9	5,04 – 37,9	2,1 – 32,5		
PLT (x10 <sup>9</sup> /L), mediana	447	452	436		0,901
Intervalo	114 – 802	114 – 740	131 – 802		
Reticulócitos (%), mediana	10,6	10,2	10,60		0,604
Intervalo	2,0 – 26	2,0 – 22,0	2,0 – 26,0		
LDH (U/L), mediana	681	759,5	622,5		0,305
Intervalo	211 – 1762	378 – 1576	211 – 1762		
BT (mg/dL), mediana	1,81	1,75	1,81		0,674
Intervalo	0,65 – 8,52	0,65 – 4,70	0,65 – 8,92		
BI (mg/dL), mediana	1,29	1,23	1,34		0,784
Intervalo	0,35 – 8,52	0,35 – 3,89	0,38 – 8,52		
Sexo					
Feminino	158 (50%)	60 (46%)	98 (53%)	1 (ref). 1,299	0,304
Masculino	158 (50%)	70 (54%)	88 (47%)	(0,82 – 2,03)	
SEA					
Sim	69 (22,5%)	18 (14%)	51 (28%)	1 (ref). 0,41	0,003*
Não	238 (77,5%)	110 (86%)	128 (72%)	(0,22 – 0,74)	
Dactilite					
Sim	100 (32,7%)	41 (32%)	59 (33%)	1 (ref). 0,95	0,902
Não	206 (67,3%)	87 (68%)	119 (67%)	(0,58 – 1,54)	
STA					
Sim	21 (6,8%)	07 (5%)	14 (8%)	1 (ref). 0,68	0,496
Não	286 (93,2%)	121 (95%)	165 (92%)	(0,26 – 1,74)	
Priapismo					
Sim	16 (10,5%)	11 (16%)	5 (6%)	1 (ref). 2,90	0,065
Não	137 (89,5)	59 (84%)	78 (94%)	(0,95 – 8,82)	
AVC					
Sim	16 (5,2%)	8 (6%)	8 (4%)	1 (ref). 1,41	0,605
Não	290 (94,8%)	120 (94%)	170 (96%)	(0,51 – 3,88)	
DTC					

<b>Normal</b>	185 (70,3%)	78 (72,9%)	107 (68,6%)	0,653
<b>Condicionante</b>	54 (20,5%)	19 (17,8%)	35 (22,4%)	
<b>Alto risco</b>	24 (9,1%)	10 (9,3%)	14 (9%)	
<b>CVO por ano, no último ano</b>				
<b>&lt; 2</b>	185 (63,1%)	75 (61%)	110 (65%)	0,801
<b>2 – 5</b>	69 (23,5%)	31 (25%)	38 (22%)	
<b>&gt; 5</b>	39 (13,3%)	17 (14%)	22 (13%)	

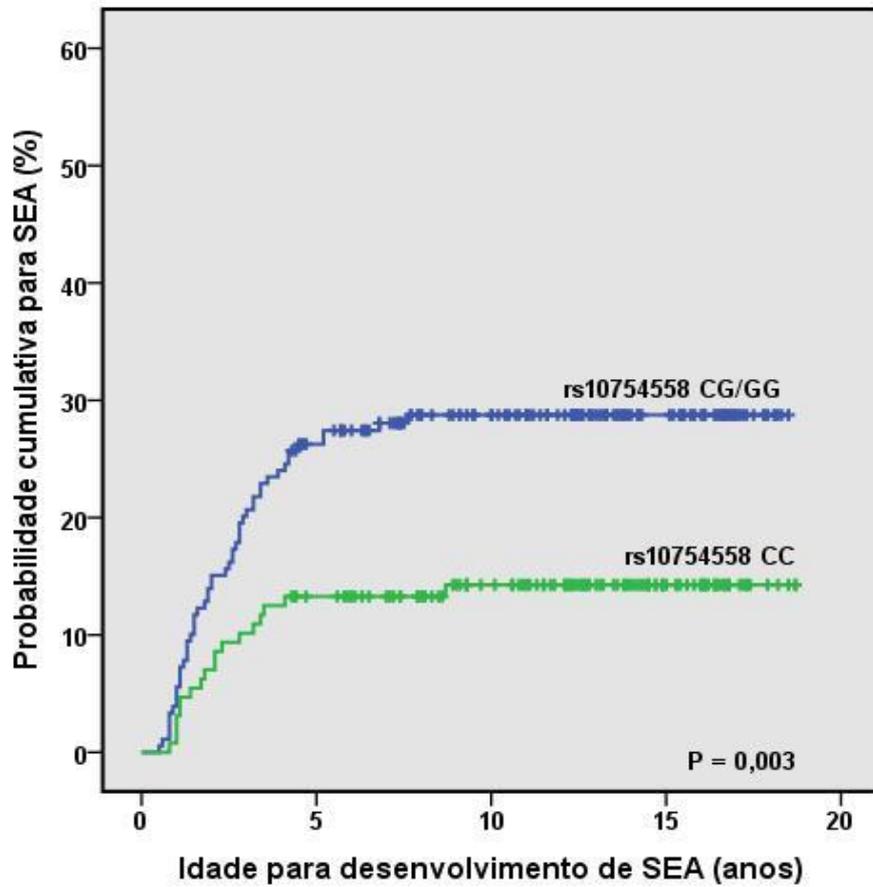
HbF: Hemoglobina fetal, RBC: Hemácias, Hb: Hemoglobina, Ht: Hematócrito, VCM, Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, WBC: Leucócitos, PLT: Plaquetas, LDH: Lactato desidrogenase, BT: Bilirrubina total, BI: Bilirrubina indireta, SEA: Sequestro esplênico agudo, STA: Síndrome torácica aguda, AVC: Acidente vascular cerebral, CVO: Crises vaso-oclusivas.

\*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

Para a análise alélica, foi observado que o alelo C do polimorfismo rs10754558 estava associado com menor frequência de desenvolvimento de sequestro esplênico em coorte pediátrica quando comparado ao alelo G ( $p = 0,0084$ ; OR: 0.59; IC 95%: 0.40 - 0.88). Nenhuma associação estatística foi observada entre os alelos do rs10754558 e o desenvolvimento de priapismo ( $p > 0,05$ ).

O impacto do polimorfismo rs10754558 no modelo dominante foi avaliado com relação ao tempo de desenvolvimento de sequestro esplênico. A média geral de seguimento estimada para desenvolvimento de SEA foi de 15 anos (IC95%: 14 a 15 anos). Os pacientes com genótipos GG e CG apresentaram um seguimento médio estimado de 13 anos (IC95%: 12 a 14) com taxa de desenvolvimento cumulativa de SEA de 28,7%. Os pacientes com genótipo CC apresentaram seguimento médio de 16 anos (IC95%: 15 a 17), com taxa de desenvolvimento de SEA de 14,3% ( $p = 0,003$ ) (figura 8).

Figura 8: Incidência cumulativa de sequestro esplênico agudo (SEA) em pacientes com AF de acordo com modelo dominante para o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3*.



Fonte: Autora, 2023

## 6. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma doença hemolítica que produz um quadro exacerbado de inflamação crônica (KATO et al., 2018). O fenômeno de falcização das hemácias é um potencializador da resposta inflamatória, culminando em crises vasooclusivas (CONRAN; BELCHER, 2018). Os inflamassomas são receptores de reconhecimento de padrões e parte importante do sistema imunológico inato. O inflamassoma NLRP3 é um dos mais estudados, normalmente estimulado por doenças inflamatórias e sua ativação culmina na liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas ativas (DAVIS; WEN; TING, 2011). Ademais, alguns SNPs do gene *NLRP3*, estão associados com o aumento da ativação de inflamassomas, como o rs10754558 (ZHANG et al., 2011). Nos pacientes com AF, níveis de NLRP3, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-18 encontram-se elevados, quando comparados em indivíduos saudáveis, o que sugere a importância do inflamassoma e polimorfismos no gene *NLRP3* na fisiopatologia da doença.

Nesse trabalho foi observado a associação do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* com o risco de desenvolvimento do sequestro esplênico agudo em pacientes com AF, indivíduos com genótipo CC apresentavam menor frequência de SEA ( $p=0,003$ ; OR: 0,41; IC:95%: 0,22 – 0,74), em comparação aos genótipos CG e GG. Na AF, perturbações que envolvem a retenção de hemácias e diminuição o volume do sangue, como o SEA, estão relacionadas com o aumento da mortalidade quando não há tratamento (BALLAS et al., 2010). O SEA é tipicamente observado em crianças com AF e está associado com eventos de falcização das hemácias e vasooclusão nos sinusóides esplênicos (KATO et al., 2018). O aprisionamento das hemácias no baço está relacionado com a hipoxia local, e esse evento favorece a diminuição do volume do sangue, por isso, pacientes acometidos com essa complicação clínica necessitam de transfusão para evitar o choque hipovolêmico (BROUSSE et al., 2012).

O polimorfismo (G/C) do gene *NLRP3* está relacionado com a estabilidade e expressão de mRNA, de forma que, o alelo C atua diminuindo a estabilidade do mRNA de *NLRP3*, quando comparado com o alelo G (HITOMI et al., 2009). Ao avaliarem o genótipo e frequências alélicas de rs10754558 em pacientes portadores de artrite gotosa aguda, ZHANG et al., (2018) observaram que indivíduos com genótipo GG

apresentaram maior risco de desenvolver gota em comparação aqueles portadores do genótipo CC. Além disso, eles relataram também, associação estatística entre o SNP do gene *NLRP3* e os níveis de mRNA de IL1 $\beta$  e IL1 $\beta$  sérica ( $p < 0,0001$ ) nesses pacientes. Addobbati e colaboradores mostraram que o polimorfismo rs10754558 estava associado ao desenvolvimento de artrite reumatoide ( $p = 0,044$ ) (ADDOBBATI et al., 2018). Achados de Ehtesham e colaboradores revelaram associação significativa entre o genótipo GG de rs10754558 com risco aumentado do lúpus eritematoso sistêmico (OR = 2,82; IC95%: 1,45-5,46), ademais, o alelo G estava correlacionado com a gravidade da doença ( $p < 0,001$ ) (EHTESHAM et al., 2021).

A ativação do inflamassoma NLRP3 mediada por PAMPs e DAMPs e pela liberação de IL-1 $\beta$  resultou em dano a células mononucleares totais do sangue periférico (PBMC) em pacientes com DF, de acordo com os estudos realizados por DE FREITAS DUTRA et al., (2022). Além disso, foi relatado também, a associação de polimorfismos de ganho de função do gene *NLRP1* com a apresentação clínica leve, sugerindo que outros receptores do inflamassoma podem estar envolvidos na DF. Estudos realizados por ZHU et al., (2016) demonstraram associações significativas entre o SNP rs10754558 com a suscetibilidade ao AVC isquêmico. Por meio da análise estratificada, foi identificado que a hipertensão poderia interagir com o polimorfismo para regular positivamente o risco do AVC. Além disso, análises de expressão de *NLRP3* revelaram que o alelo variante G apresentava maiores níveis de transcrição do gene *NLRP3* (1,36 a 1,88 vezes) em comparação com o alelo C.

Associado a isto, em nosso estudo, na análise alélica, foi observado que o alelo C do polimorfismo rs10754558 estava associado com menor frequência de desenvolvimento de sequestro esplênico quando comparado ao alelo G ( $p = 0,0084$ ; OR: 0.59; IC 95%: 0.40 - 0.88). A incidência acumulativa também foi analisada, pacientes com genótipos GG e CG apresentaram taxa de desenvolvimento cumulativa de SEA de 28,7%. E os pacientes com genótipo CC apresentaram taxa de desenvolvimento de SEA de 14,3%. Até o momento, nosso estudo foi o primeiro a analisar essas associações entre o rs10754558 e o SEA em pacientes com AF. Portanto, visto que, o SEA é desencadeado, principalmente por eventos inflamatórios, a desregulação do complexo NLRP3 pode atuar como fator de risco. Dessa forma, é provável que indivíduos com genótipo CC para o polimorfismo rs10754558, possuam menores níveis de NLRP3 e de citocinas, o que contribui para menor risco de

desenvolvimento do SEA.

Demonstramos, também, que indivíduos com AF e genótipo CC para o polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* apresentam uma frequência maior de priapismo ( $p=0,065$ ; OR: 2,9; IC:95%: 0,95 – 8,82). As análises mostraram que os pacientes com genótipo CC possuem uma maior taxa para o desenvolvimento do priapismo (16%), quando comparado aos genótipos CG e GG (6%). No entanto, essa análise não foi significativa, pois nenhuma associação estatística foi observada entre o polimorfismo e o desenvolvimento do priapismo ( $p > 0,05$ ), condição que acomete apenas o sexo masculino, comum na AF. De acordo com WANG et al., (2016), é provável que a etiologia do priapismo se baseia na disfunção da via do óxido nítrico, resultando em hipóxia e falcização das hemácias, de modo que o sangue se sedimenta nos corpos cavernosos. Nessa conjuntura, estudos feitos em camundongos machos, determinaram que quando inibido, o NLRP3 leva ao comprometimento do relaxamento dos corpos cavernosos mediado pelo NO, e quando ativado, diminui a sensibilidade dos corpos cavernosos ao NO e o relaxamento do endotélio (FAIS et al., 2019).

Desse modo, de acordo com os resultados aqui demonstrados, considerando o papel do inflamassoma NLRP3 no desencadeamento de quadro inflamatório exacerbado e que a AF é caracterizada por um quadro de inflamação crônica, a investigação da associação do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* com o SEA é importante para identificação de possíveis marcadores prognósticos, uma vez que é sabido do risco dessa complicação no estado clínico dos pacientes e da contribuição para a fisiopatologia desta doença. Além disso, mais estudos são necessários para esclarecer o papel do rs10754558 do gene *NLRP3* na fisiopatologia do SEA, além de investigar o papel de variantes genéticas de NLRP3 no priapismo.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se que:

- O polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* não mostrou associação com as variáveis laboratoriais em pacientes com AF de nossa população;
- O polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* mostrou-se associado com desenvolvimento de SEA em indivíduos com AF;
- Indivíduos com genótipo homocigoto selvagem CC apresentavam menor frequência de SEA em comparação aos genótipos heterocigoto (CG) e homocigoto recessivo (GG).

## REFERÊNCIAS

- ABDERRAZAK, A. et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Redox Biology**, v. 4, p. 296–307, 2015.
- ADAMS, R. J. et al. Transcranial doppler correlation with cerebral angiography in sickle cell disease. **Stroke**, v. 23, n. 8, p. 1073–1077, 1992.
- ADAMS, R. J. et al. Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia. **Controlled Clinical Trials**, v. 19, n. 1, p. 110–129, 1998.
- ADAMS, R. J. Prevention of stroke in sickle cell anemia. **Journal of Law, Medicine and Ethics**, v. 42, n. 2, p. 135–138, 2014.
- ADDOBBATI, C. et al. Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. **Inflammation Research**, v. 67, n. 3, p. 255–264, 2018.
- AKINGBOLA, T. S. et al. Comparison of patients from Nigeria and the USA highlights modifiable risk factors for sickle cell anemia complications. **Hemoglobin**, v. 38, n. 4, p. 236–243, 2014.
- ALI, M. A. et al. Efficacy and safety of recently approved drugs for sickle cell disease: a review of clinical trials. **Experimental Hematology**, v. 92, p. 11- 18.e1, 2020.
- ANELE, U. A. et al. How I treat priapism. **Blood**, v. 125, n. 23, p. 3551–3558, 2015.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 1, p. 6–13, 2010.
- BELCHER, J. D. et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 3, p. 377–390, 2014.
- BISWAL, S. et al. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. **Hematology**, v. 24, n. 1, p. 1–9, 2019.
- BOZZA, M. T.; JENEY, V. Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. June, p. 1–13, 2020.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença Falciforme: Diretrizes Básicas da Linha de Cuidado**. [s.l: s.n.]. v. 1, 2015.
- BREWIN, J.; KAYA, B.; CHAKRAVORTY, S. How I manage sickle cell patients with high transcranial doppler results. **British Journal of Haematology**, v. 179, n. 3, p. 377–388, 2017.

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

CINTHO OZAHATA, M. et al. Clinical and Genetic Predictors of Priapism in Sickle Cell Disease: Results from the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study III Brazil Cohort Study. **Journal of Sexual Medicine**, v. 16, n. 12, p. 1988–1999, 2019.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 263–299, 2018.

DARBARI, D. S.; SHEEHAN, V. A.; BALLAS, S. K. The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. **European Journal of Haematology**, v. 105, n. 3, p. 237–246, 2020.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. Y. The Inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 707–735, 2011.

DE FREITAS DUTRA, V. et al. Genetic contribution and functional impairment of inflammasome in sickle cell disease. **Cytokine**, v. 149, p. 155717, 2022.

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

EHTESHAM, N. et al. Three functional variants in the NLRP3 gene are associated with susceptibility and clinical characteristics of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 30, n. 8, p. 1273–1282, 2021.

EMOND, A. M. et al. Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: Natural history and management. **The Journal of Pediatrics**, v. 107, n. 2, p. 201–206, 1985.

FAIS, R. S. et al. The inflammasome NLRP3 plays a dual role on mouse corpora cavernosa relaxation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2019.

FRANCHI, L. et al. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 241–247, 2009.

GALIZA NETO, G. C. DE; PITOMBEIRA, M. DA S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, 2003.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.

HERRICK, J. B.; JAMES, B. Peculiar Physical. **Archives of Internal Medicine**, v. 6, n. 5, p. 517, 1910.

HITOMI, Y. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, p. 779- 785.e6, 2009.

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

JAIN, S.; BAKSHI, N.; KRISHNAMURTI, L. Acute Chest Syndrome in Children with Sickle Cell Disease. **Pediatric, Allergy, Immunology, and Pulmonology**, v. 30, n. 4, p. 191–201, 2017.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–22, 2018.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Reviews**, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666–671, 2015.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 1–24, 2019.

LEBENSBURGER, J. D. et al. Hydroxyurea therapy requires HbF induction for clinical benefit in a sickle cell mouse model. **Haematologica**, v. 95, n. 9, p. 1599–1603, 2010.

LINUS, P. et al. Cell Anemia, a Molecular. **Science**, v. 110, n. 3, p. 543–548, 1949.

LOTTENBERG, R.; HASSELL, K. L. An evidence-based approach to the treatment of adults with sickle cell disease. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 58–65, 2005.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. [Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil]. **Revista de saude publica**, v. 39, n. 6, p. 943–9, 2005.

MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MISSIROLI, S. et al. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 3, 2018.

MISSIROLI, S. et al. Targeting the nlrp3 inflammasome as a new therapeutic option for overcoming cancer. **Cancers**, v. 13, n. 10, p. 1–26, 2021.

- NYAKUNDI, B. B. et al. Oxidized hemoglobin forms contribute to NLRP3 inflammasome-driven IL-1 $\beta$  production upon intravascular hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 2, p. 464–475, 2019.
- OZBAYER, C. et al. NLRP3-Inflammasome Gene Variations in the Risk of Type 2 Diabetes. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 41, n. 2, p. 1–13, 2022.
- PICCIN, A. et al. Insight into the complex pathophysiology of sickle cell anaemia and possible treatment. **European Journal of Haematology**, v. 102, n. 4, p. 319–330, 2019.
- PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 8, 2010.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.
- PITANGA, T. N. et al. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. **Cytokine**, v. 83, p. 75–84, 2016.
- PLATT, O. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med.**, v. 320, n. 23, p. 1639–1644, 1994.
- PONTILLO, A. et al. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 59, n. 2, p. 121–125, 2012.
- RANKINE-MULLINGS, A. E. et al. Transcranial Doppler velocity among Jamaican children with sickle cell anaemia: determining the significance of haematological values and nutrition. **British Journal of Haematology**, v. 181, n. 2, p. 242–251, 2018.
- RICHARDS, M. W. et al. An Autoinhibitory Tyrosine Motif in the Cell-Cycle-Regulated Nek7 Kinase Is Released through Binding of Nek9. **Molecular Cell**, v. 36, n. 4, p. 560–570, 2009.
- SCHRODER, K. et al. Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. **Immunobiology**, v. 217, n. 12, p. 1325–1329, 2012.
- SERJEANT, G. R.; VICHINSKY, E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, n. March, p. 66–77, 2018.
- SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 617–629, 2016.

STEINBERG, M. H. et al. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 48, n. 3, p. 175–181, 1995.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295–1324, 2008.

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

STYPULKOWSKI, J. B.; MANFREDINI, V. Changes in hemostasis in sickle cell disease patients. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 1, 2010.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 263–292, 2019.

VILLANI, A. C. et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. **Nature Genetics**, v. 41, n. 1, p. 71–76, 2009.

WANG, H. H. S. et al. Trends in Sickle Cell Disease-related Priapism in U.S. Children's Hospitals. **Urology**, v. 89, p. 118–122, 2016.

WONG, W. Y.; POWARS, D. R. Overt and Incomplete (Silent) Cerebral Infarction in Sickle Cell Anemia: Diagnosis and Management. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 269–280, 2007.

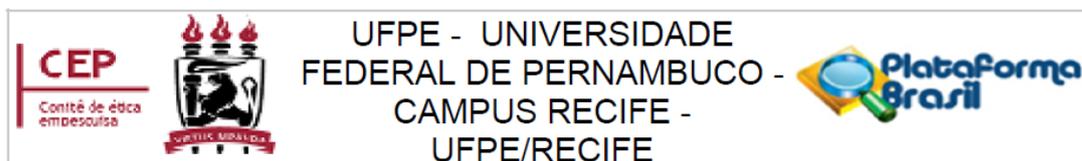
ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: Da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207–214, 2007.

ZHANG, A. Q. et al. Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms within the entire NLRP3 gene in patients with major blunt trauma. **Critical Care**, v. 15, n. 6, 2011.

ZHANG, Q. B. et al. Association of NLRP3 polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis in a Chinese han population. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 1, p. 235–244, 2018.

ZHOU, R. et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 221–226, 2011.

ZHU, Z. et al. A Polymorphism Within the 3'UTR of NLRP3 is Associated with Susceptibility for Ischemic Stroke in Chinese Population. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 6, p. 981–988, 2016.

**ANEXOS****ANEXO A****CÓPIA DO PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Investigação da associação de polimorfismos no gene NLRP3 com a ocorrência de complicações clínicas em pacientes com anemia falciforme

**Pesquisador:** ALEXSANDRO PEDRO DA SILVA

**Área Temática:** Genética Humana;  
(Trata-se de pesquisa em genética do comportamento.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 49179421.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** Centro de Biosciências

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.883.963

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Sim

RECIFE, 05 de Agosto de 2021

---

**Assinado por:**  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
(Coordenador(a))

## ANEXO B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **“INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Alexsandro Pedro da Silva (E-mail: alexsandropedro78@gmail.com) e sob a orientação do professor Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (macbezerraufpe@gmail.com). Também participam desta pesquisa: Dr. Aderson da Silva Araújo ([aderson.araujo@gmail.com](mailto:aderson.araujo@gmail.com)), Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo ([araujoarl@gmail.com](mailto:araujoarl@gmail.com)) e Dra. Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer (betanialucena@yahoo.com.br).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema. Desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- A anemia falciforme é uma doença grave que altera células do seu sangue, provocando dores o que pode estar interferindo em suas atividades do dia a dia. Esta doença é causada pela presença de uma hemoglobina alterada (molécula importante para o funcionamento das células do sangue), a hemoglobina S. Alguns pacientes com anemia falciforme apresentam manifestações clínicas diferentes devido os processos de vasoclusão e inflamação crônica. Dessa forma, o objetivo do nosso trabalho é entender a variedade genética relacionada à inflamação que pode atuar na ocorrência das complicações da doença. Dessa forma, gostaríamos que você doasse 8 ml de sangue (quantidade correspondente a 2 tubos pequenos de coleta de sangue), obtidos usando agulhas e seringas descartáveis, coletados por profissionais capacitados, uma única vez durante sua visita de rotina ao HEMOPE – Recife - PE. Gostaríamos ainda de solicitar sua autorização para utilização dos dados clínicos coletados em prontuários durante seu período de acompanhamento clínico no HEMOPE – Recife - PE.
- O risco por nós avaliado é que em função da coleta de sangue, pode haver a formação de um pequeno hematoma local, além da ocorrência de uma dor leve resultante da picada de agulha. Isto pode ser amenizado colocando compressas de gelo nas primeiras horas após a coleta, em seguida, podem ser colocadas compressas mornas para ajudar a eliminar o hematoma mais rapidamente. Além disso, existe a possibilidade de quebra de sigilo por meio da identificação dos pacientes, ainda que involuntária ou extravio dos exames dos prontuários. A forma de amenizar é por meio do compromisso,

confidencialidade e sigilo dos dados coletados, garantindo que as informações não serão divulgadas fora desse projeto.

- Como resultado desta pesquisa não estão previstos benefícios diretos para você, entretanto, como benefício indireto os dados obtidos com este estudo poderão ser úteis na busca de novos medicamentos com alvos eficientes e poucas reações adversas para tratar e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com anemia falciforme.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal sob a responsabilidade do pesquisador responsável, no endereço acima informado, pelo período mínimo de 5 anos após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (E-mail: [cephumanos.ufpe@ufpe.br](mailto:cephumanos.ufpe@ufpe.br)).

---

(Assinatura do pesquisador)

## CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar no estudo **“INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE *NLRP3* COM A OCORRÊNCIA DE COMPLICAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do (a) participante

Impressão Digital

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: