



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POLIMORFISMOS NO GENE *KLOTHO* E
HEMOGLOBINOPATIA SC (*HBB* glu6val E glu6lys):
ASSOCIAÇÃO COM SUBFENÓTIPOS DA DOENÇA.**

ANA PAULA ALMEIDA DE SOUZA PACHECO

Salvador – Bahia – Brasil

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**POLIMORFISMOS NO GENE *KLOTHO* E
HEMOGLOBINOPATIA SC (*HBB* glu6val E glu6lys):
ASSOCIAÇÃO COM SUBFENÓTIPOS DA DOENÇA.**

ANA PAULA ALMEIDA DE SOUZA PACHECO

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-graduação em Patologia, área
de concentração em Patologia Experimental,
como pré-requisito obrigatório para obtenção
do grau de Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil

2013

Klotho

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P116p Pacheco, Ana Paula Almeida de Souza
Polimorfismos no gene *KLOTHO* e hemoglobinopatia SC (*HBB* glu6val e glu6lys): associação com subfenótipos da doença [manuscrito] / Ana Paula Almeida de Souza Pacheco. - 2013.
116 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marilda de Souza Gonçalves, Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional.

1. Polimorfismo. 2. Genética. 3. Hemoglobinopatia SC. I.Título.
CDU 616-006.6:616.24

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Diretoria de Programas Temáticos e Setoriais – DPT/CNPq e Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – DECIT/SCTIE-MS;
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue – INCTS;
- *National Institute of Health (NIH) – Fogarth International Center.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida, e todas as oportunidades de aprimoramento moral;

A minha orientadora Dr^a Marilda de Souza Gonçalves, pela confiança, o respeito, os ensinamentos acadêmicos e morais, e a sua sincera e incondicional amizade;

Aos meus queridos pais, Tereza e Ubaldo, cujo amor infinito, o zelo profundo e o apoio constante me fizeram crescer e prosperar no caminho do bem; à minha irmã Luisa, pela infinita amizade e amor que sempre existirão entre nós, e ao seu esposo Brasilino, por representar uma nova e duradoura amizade; ao meu esposo Waltemir, pelo amor, paciência e companheirismo, os quais me ajudaram a persistir em momentos difíceis;

À memória de meu sobrinho Luis Antônio, pelo breve, porém intenso espaço de tempo em que esteve entre nós, me proporcionando as horas mais felizes que já vivi;

Ao Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), por permitir a utilização das instalações sob sua coordenação;

Aos meus professores e colegas da Pós-graduação, pelos momentos de superação e apoio mútuos, bem como pelos ensinamentos dispensados;

Aos colegas, funcionários e professores da Faculdade de Farmácia da UFBA, pelos primeiros passos na minha formação profissional e acadêmica;

Aos colegas do LPBM, pelo apoio durante a minha iniciação na estrada científica;

Aos colegas do grupo de Hemoglobinopatias, sob a chefia da Dr^a Marilda, dos quais surgiram boas amizades;

Aos amigos da Histotecnologia, inclusive Ana Carvalho e Cristina (do grupo da imuno-histoquímica) pelo carinho, apoio, compreensão e incentivo durante este período;

Aos médicos, funcionários e pacientes (e seus responsáveis) da Fundação HEMOBA, pela confiança e por permitirem o acontecimento deste estudo;

Ao Dr. Ricardo David Couto e aos funcionários do HUPES, por viabilizarem a realização das determinações de vitamina D e paratormônio em seu equipamento;

Enfim, a todos que me apoiaram direta ou indiretamente para a concretização desta etapa, meus sinceros agradecimentos.

“Vive em tua época. Esforça-te e realiza, alegra-te e sofre com os teus contemporâneos; todavia, de quando em quando, recolhe-te ao abrigo da consciência e escuta as antigas verdades sempre novas que te anunciam o Reino de Deus!... Para reformulá-las, os Espíritos do Senhor se espalham presentemente no planeta, constituindo legiões... Eles nos ensinam – a nós, os tarefeiros encarnados e desencarnados da seara enorme – que o ódio será banido das nações, que o egoísmo desaparecerá da Terra, que a Ciência instruirá a ignorância, que a compaixão converterá todos os cárceres em sanatórios e que a educação espiritual extinguirá todos os focos de delinquência!... Para isso, no entanto, eles te rogam o tijolo de trabalho e de amor que possas oferecer à sublime edificação.

Ama e serve sempre.

Tudo o que te aflige ou te espanta, nas conquistas da inteligência de hoje, representa ensaio da supercultura de que o mundo amanhã aproveitará o que seja melhor, e, acima de todas as lendas que gritam ainda agora por fraternidade e reivindicação, ouviremos como proclamação mais alta a palavra de Jesus, no apelo inesquecível: “Amai-vos uns aos outros como eu vos amei”.

Chico Xavier
(pelo Espírito Emmanuel)

PACHECO, Ana Paula Almeida de Souza. Polimorfismos no gene *Klotho* e hemoglobinopatia SC (*HBB* glu6val e glu6lys): Associação com subfenótipos da doença. 116 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

A variabilidade clínica descrita na doença falciforme (DF) tem sido associada ao efeito epistático de vários genes, a exemplo do gene *Klotho* (*Kl*), cujos polimorfismos interferem na regulação de canais de potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e fósforo, na expressão de vitamina D (VitD) e paratormônio (PTH), e na supressão do estresse oxidativo. Com isto, o presente estudo teve por objetivos investigar a frequência de SNPs no *Kl* em indivíduos com hemoglobinopatia SC (HbSC), associando-os a marcadores de gravidade e subfenótipos da doença e investigar associações entre os níveis de K^+ , Ca^{2+} , fósforo, VitD e PTH com tais marcadores de gravidade. Foi desenvolvido um estudo de corte transversal com 113 indivíduos com HbSC provenientes da Fundação HEMOBA, Salvador-Ba. As análises hematológicas foram realizadas em contador eletrônico de células; o perfil de hemoglobinas foi confirmado pela cromatografia líquida de alto desempenho; os marcadores lipídicos, de hemólise, de função hepática e renal, Ca^{2+} e fósforo foram avaliados por método colorimétrico, assim como o K^+ , por eletrodo de íon seletivo; as concentrações de VitD e PTH foram investigadas por quimioluminescência e de anti-estreptolisina-O (ASLO) e proteína C reativa (PCRe) por nefelometria; os SNPs no *Kl* (rs1207568, rs9527025, rs564481 e rs648202) foram genotipados pelo ensaio de discriminação alélica pelo sistema TaqMan; os haplótipos dos genes da globina beta foram investigados pela reação da polimerase em cadeia - com restrição dos fragmentos com endonucleases de restrição (PCR-RFLP). Os dados clínicos foram coletados em prontuários médicos. O SNP rs1207568 foi associado à ocorrência de infecções ($P=0,0170$) e a níveis séricos elevados de albumina ($P=0,0370$), o SNP rs648202 foi associado ao uso de medicações ($P=0,0208$) e o SNP rs9527025 a níveis elevados de fósforo e bilirrubina direta (BD) ($P=0,0044$ e $P=0,0092$, respectivamente). O K^+ foi positivamente correlacionado com os leucócitos ($r=0,2916$, $P=0,0034$), linfócitos típicos ($r=0,2644$, $P=0,0082$), monócitos ($r=0,2370$, $P=0,0182$), plaquetas ($r=0,4889$, $P<0,0001$), colesterol total ($r=0,2521$, $P=0,0118$), colesterol LDL (Col-LDL) ($r=0,2953$, $P=0,0030$), fósforo ($r=0,2447$, $P=0,0277$), proteínas totais (PTs) ($r=0,2415$, $P=0,0160$), ferritina ($r=0,2263$, $P=0,0283$), PCRe ($r=0,2369$, $P=0,0222$) e HbS ($r=0,2474$, $P=0,0135$). O K^+ teve correlação negativa com hemácias ($r=-0,2076$, $P=0,0392$) e Hb fetal ($r=-0,2328$, $P=0,0204$). O Ca^{2+} apresentou correlação positiva com PTs ($r=0,2991$, $P=0,0028$) e albumina ($r=0,3242$, $P=0,0011$) e negativa com o ASLO ($r=-0,2216$, $P=0,0309$). O fósforo foi negativamente correlacionado com Hb ($r=-0,3083$, $P=0,0051$), hematócrito ($r=-0,2610$, $P=0,0186$), bilirrubina indireta ($r=-0,2685$, $P=0,0154$) e creatinina ($r=-0,3844$, $P=0,0004$). Houve correlação positiva entre fósforo e eosinófilos ($r=0,4383$, $P<0,0001$), linfócitos típicos ($r=0,2560$, $P=0,0211$), plaquetas ($r=0,3598$, $P=0,0010$), as transaminases AST ($r=0,3088$, $P=0,0050$) e ALT ($r=0,2203$, $P=0,0481$) e com a fosfatase alcalina ($r=0,5185$, $P<0,0001$). A VitD foi correlacionada negativamente com ferro ($r=-0,3459$, $P=0,0006$), volume corpuscular médio ($r=-0,2071$, $P=0,0441$), BD ($r=-0,2629$, $P=0,0101$) e PTH ($r=-0,3689$, $P=0,0004$), e positivamente com reticulócitos ($r=0,2361$, $P=0,0220$), linfócitos típicos ($r=0,2306$, $P=0,0245$) e PCRe ($r=0,2113$, $P=0,0420$). O PTH teve correlação negativa com leucócitos ($r=-0,2618$, $P=0,0143$), linfócitos típicos ($r=-0,2966$, $P=0,0053$), monócitos ($r=-0,2723$, $P=0,0107$), colesterol total ($r=-0,2282$, $P=0,0335$), Col-LDL ($r=-0,2470$, $P=0,0211$), BD ($r=-0,2462$, $P=0,0443$) e AST ($r=-0,2274$, $P=0,0342$). Neste estudo, o K^+ , fósforo, VitD, PTH e

os SNPs no *Kl* se mostraram úteis para a avaliação da gravidade clínica em indivíduos com HbSC.

PALAVRAS-CHAVE: Klotho, Hemoglobinopatia SC, Potássio, Cálcio, Fósforo, Vitamina D, Paratormônio.

PACHECO, Ana Paula Almeida de Souza. *Klotho* polymorphisms and hemoglobinopathy SC (*HBB* glu6val and glu6lys): Association with the disease subphenotypes. 116 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

The clinical variability described in sickle cell disease (SCD) has been linked to epistatic effect of various genes, such as *Klotho* (*Kl*), whose polymorphisms affect the potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}) and phosphorus channels regulation, the vitamin D (VitD) and parathyroid hormone (PTH) expression, and oxidative stress suppression. With this, the present study aims to investigate the *Kl* SNPs frequency in hemoglobinopathy SC (HbSC) individuals, associating them with markers of severity and disease sub-phenotypes, and to investigate associations between K^+ , Ca^{2+} , phosphorus, VitD and PTH levels with such gravity markers. We developed a cross-sectional study of 113 individuals with HbSC from HEMOBA Foundation, Salvador - Ba. The hematological values were determined in electronic cell counter; the hemoglobin (Hb) profile were confirmed by high performance liquid chromatography; the lipid, hemolysis, liver and kidney markers, Ca^{2+} and phosphorus were evaluated by colorimetric method, as well as the K^+ by ion selective electrode; the VitD and PTH concentrations were investigated by chemiluminescence and the anti-streptolysin O (ASO) and C-reactive protein (PCRe) by nephelometry; the *Kl* SNPs (rs1207568, rs9527025, rs564481 and rs648202) were genotyped by allelic discrimination assay by TaqMan system for genotyping; the beta globin genes haplotypes were investigated by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Clinical data were collected from medical records. The SNP rs1207568 was associated with the infection occurrence ($P=0.0170$) and raised serum albumin levels ($P=0.0370$), the SNP rs648202 was associated with the medications use ($P=0.0208$) and the SNP rs9527025 with raised direct bilirubin (BD) and phosphorus levels ($P=0.0044$ and $P=0.0092$, respectively). The K^+ was positively correlated with leukocytes ($r=0.2916$, $P=0.0034$), typical lymphocytes ($r=0.2644$, $P=0.0082$), monocytes ($r=0.2370$, $P=0.0182$), platelets ($r=0.4889$, $P<0.0001$), total cholesterol ($r=0.2521$, $P=0.0118$), LDL cholesterol (Col-LDL) ($r=0.2953$, $P=0.0030$), phosphorus ($r=0.2447$, $P=0.0277$), total proteins (PTs) ($r=0.2415$, $P=0.0160$), ferritin ($r=0.2263$, $P=0.0283$), PCRe ($r=0.2369$, $P=0.0222$) and Hb ($r=0.2474$, $P=0.0135$). The K^+ had a negative correlation with red blood cells ($r=-0.2076$, $P=0.0392$) and fetal Hb ($r=-0.2328$, $P=0.0204$). The Ca^{2+} was positively correlated with PTs ($r=0.2991$, $P=0.0028$) and albumin ($r=0.3242$, $P=0.0011$) and negatively with the ASO ($r=-0.2216$, $P=0.0309$). The phosphorus was negatively correlated with Hb ($r=-0.3083$, $P=0.0051$), hematocrit ($r=-0.2610$, $P=0.0186$), indirect bilirubin ($r=-0.2685$, $P=0.0154$) and creatinine ($r=-0.3844$, $P=0.0004$). There was a positive correlation between phosphorus and eosinophils ($r=0.4383$, $P<0.0001$), typical lymphocytes ($r=0.2560$, $P=0.0211$), platelet count ($r=0.3598$, $P=0.0010$), the transaminases AST ($r=0.3088$, $P=0.0050$) and ALT ($r=0.2203$, $P=0.0481$) and with the alkaline phosphatase ($r=0.5185$, $P<0.0001$). The VitD was negatively correlated with iron ($r=-0.3459$, $P=0.0006$), mean corpuscular volume ($r=-0.2071$, $P=0.0441$), BD ($r=-0.2629$, $P=0.0101$) and PTH ($r=-0.3689$, $P=0.0004$), and positively with reticulocytes ($r=0.2361$, $P=0.0220$), typical lymphocytes ($r=0.2306$, $P=0.0245$) and PCRe ($r=0.2113$, $P=0.0420$). The PTH had a negative correlation with leukocytes ($r=-0.2618$, $P=0.0143$), typical lymphocytes ($r=-0.2966$, $P=0.0053$), monocytes ($r=-0.2723$, $P=0.0107$) and total cholesterol ($r=-0.2282$, $P=0.0335$), Col-LDL ($r=-0.2470$, $P=0.0211$), BD ($r=-0.2462$, $P=0.0443$) and AST ($r=-0.2274$, $P=0.0342$). In this study,

the K^+ , phosphorus, VitD, PTH and the *KI* SNPs evaluated proved useful parameter for evaluating the clinical severity in individuals with HbSC.

KEYWORDS: Klotho, Hemoglobinopathy SC, Potassium, Calcium, Phosphorus, Vitamin D, Parathyroid hormone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Expressão normal das cadeias de globinas. (Adaptado de HIGGS <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 2	Fluxograma do modelo experimental.....	35
Figura 3	Comparação dos marcadores estudados entre os diferentes genótipos dos SNPs no gene <i>Klotho</i> em indivíduos HbSC: comparação dos valores médios de albumina (A) entre indivíduos HbSC com genótipos selvagem e aqueles com genótipo heterozigoto para o SNP rs1207568, e dos valores médios de fósforo (B) e BD (C) entre indivíduos HbSC com genótipos selvagem e mutante para o SNP rs9527025.....	50
Figura 4	Correlação entre os níveis séricos de potássio e contagem de leucócitos (A1), linfócitos típicos (B1) e monócitos (C1), acompanhada pela análise dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2), além das análises com a mediana (A3, B3 e C3).....	52
Figura 5	Correlação entre os níveis séricos de potássio e a contagem de plaquetas (A1), acompanhada pela análise dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2) e mediana (A3).....	53
Figura 6	Correlação entre os níveis séricos de potássio e colesterol total (A1) e Col-LDL (B1), e análise dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	55
Figura 7	Correlação entre os níveis séricos de potássio e fósforo (A1), acompanhada pelos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2) e mediana (A3)	56
Figura 8	Correlação entre os níveis séricos de potássio e PTs (A1), ferritina (B1) e PCRe (C1), acompanhada pelos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3).....	58
Figura 9	Análise de correlação entre os níveis séricos de potássio e hemácias (A1), HbF (B1) e HbS (C1), com suas respectivas análises dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3).....	60
Figura 10	Correlação entre os níveis séricos de cálcio e PTs (A1) e albumina (B1), acompanhada pelos valores médios de cálcio para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	62

Figura 11	Correlação entre os níveis séricos de cálcio e ASLO (A1), acompanhada pela análise dos valores médios de cálcio para os percentis 25% e 75% (A2) e mediana (A3).....	63
Figura 12	Correlação entre os níveis séricos de fósforo e concentração de Hb (A1) e Ht (B1), acompanhada pelos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	65
Figura 13	Correlação entre os níveis séricos de fósforo e a contagem de eosinófilos (A1), linfócitos típicos (B1) e plaquetas (C1), acompanhada pelos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3).....	67
Figura 14	Correlação entre os níveis séricos de fósforo e AST (A1) e BI (B1), acompanhada pela análise dos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	69
Figura 15	Correlação entre os níveis séricos de fósforo e creatinina (A1), ALT (B1) e FAL (C1), acompanhada pelos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3)	71
Figura 16	Correlação entre os níveis séricos de VitD e ferro sérico (A1) e VCM (B1), acompanhada pelos valores médios de VitD para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	73
Figura 17	Correlação entre os níveis séricos de VitD e BD (A1) e contagem de reticulócitos (B1), acompanhada pelos valores médios de VitD para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	75
Figura 18	Correlação entre os níveis séricos de VitD e linfócitos típicos (A1), PCRe (B1) e PTH (C1), acompanhada pelos valores médios de VitD para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3)	77
Figura 19	Correlação entre os níveis séricos de PTH e contagem de leucócitos (A1), linfócitos típicos (B1) e monócitos (C1), acompanhada pela análise dos valores médios de PTH para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3)	79
Figura 20	Análises de correlação entre os níveis séricos de PTH e colesterol total (A1) e sua fração Col-LDL (B1), bem como a análise dos valores médios de PTH para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3)	81

Figura 21	Correlação entre os níveis séricos de PTH e os níveis de BD (A1) e AST (B1), acompanhada pelos valores médios de PTH para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3).....	83
Figura 22	Resumo das interações propostas a partir dos resultados obtidos neste estudo, no que diz respeito à relação entre SNPs no gene <i>Klotho</i> , bem como os níveis de potássio, cálcio, fósforo, vitamina D e paratormônio, com as alterações inerentes à Hemoglobinopatia SC	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação e descrição dos SNPs no gene <i>Kl</i> avaliados no estudo	38
Tabela 2	Sequências de <i>primers</i> e fluoróforos utilizados para cada SNP nas reações de <i>Real Time</i> PCR	39
Tabela 3	Relação dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR, a localização da região gênica estudada, o tamanho do fragmento gerado e a endonuclease de restrição para cada região das reações para haplótipo.....	40
Tabela 4	Condições de reação para os PCRs e RFLPs.....	41
Tabela 5	Características gerais dos indivíduos com doença SC incluídos no estudo.....	45
Tabela 6	Histórico das manifestações clínicas e de intervenção entre os indivíduos HbSC	46
Tabela 7	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs no gene <i>Kl</i> nos indivíduos com HbSC, com cálculo do equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
A1AT	Alfa 1-antitripsina
AF	Anemia falciforme
Ala	Alanina
ALT	Alanina aminotransferase
Arg	Arginina
ASB	Albumina bovina sérica
ASLO	Anticorpo antiestreptolisina O (ASO - <i>anti-streptolysin O</i>)
AST	Aspartato aminotransferase
Atp	Haplótipo caracterizado como Atípico
BD	Bilirrubina direta
BEN	Haplótipo do grupo Benin
BI	Bilirrubina indireta
C	Citosina
Ca ²⁺	Cálcio
CAM	Haplótipo do grupo Camarões
CAR	Haplótipo do grupo Bantu ou República Central Africana
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl ⁻	Cloro
Col-HDL	Colesterol - Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
Col-LDL	Colesterol - Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
Col-VLDL	Colesterol - Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>Very low density lipoprotein</i>)
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
<i>Cyp24</i>	Gene que codifica a 24-hidroxilase
<i>Cyp27b1</i>	Gene que codifica a 1 α -hidroxilase
Cys	Cisteína
D	Direto
DF	Doença falciforme (SCD – <i>Sickle cell disease</i>)
DHL	Desidrogenase láctica
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético di-sódico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Endonuclease de restrição
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FA	Frequência alélica
FAL	Fosfatase alcalina
FAM	<i>Fluorescein amidite</i>
FE	Frequência esperada
Fe ²⁺	Átomo de ferro no estado ferroso
FG	Frequência genotípica
FGF23	Fator de crescimento de fibroblasto-23
FGFR	Receptor do fator de crescimento de fibroblasto-23
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOXO	<i>Mammalian forkhead box O</i>
FRO	Frequência relativa observada
G	Guanina
GGT	Gama glutamiltransferase
Glu	Ácido glutâmico
Hb	Hemoglobina
HbA1	Hemoglobina 1 do adulto
HbA2	Hemoglobina 2 do adulto
HbAC	Heterozigoto para a hemoglobina C
HbAS	Heterozigoto para a hemoglobina S = Traço falciforme
<i>HBB</i>	Gene beta da globina
HbC	Hemoglobina variante C
HbCC	Homozigoto para a hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina variante S
HbSC	Heterozigoto duplo para as hemoglobinas S e C = Hemoglobinopatia SC = Doença SC
HbSS	Homozigoto para a hemoglobina S
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMOBA/SESAB	Fundação De Hematologia e Hemoterapia da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia

His	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
HS	Principal elemento regulador de ativação
Ht	Hematócrito
HUPES-UFBA	Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IRC	Insuficiência renal crônica
ISE	Eletrodo de íon seletivo
K ⁺	Potássio
Kb	Quilobases
<i>Kl</i>	Gene <i>Klotho</i>
KL	Repetição interna do domínio extracelular da proteína Klotho
LACTFAR-UFBA	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia
LCR	Região de controle do locus
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
Lys	Lisina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
N	Tamanho amostral
NA	Não se aplica
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase
NaPi-2a	Co-transportador de sódio-fosfato tipo-2a
NaPi-2b	Co-transportador de sódio-fosfato tipo-2b
NO ²⁻	Nitrito
NO ²⁺	Nitrato
ON	Óxido nítrico
P	Fósforo
PAMPs	Padrões de membrana associados a patógenos

pb	Pares de bases
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PCRe	Proteína C-reativa
Pit-1/Pit-2	Transportadores de sódio-fosfato de classe 3
PT	Proteínas totais
PTH	Paratormônio
Qsp	Quantidade suficiente para
R	Reverso
RELAG	Relação albumina/globulina
RFLP	Restrição de polimorfismo por endonuclease de restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
ROMK1	Canal de potássio da medula renal externa (<i>Renal outer medullary potassium channel 1</i>)
RXR	Receptor retinóide X (<i>Retinoid X receptor</i>)
SEN	Haplótipo do grupo Senegal
Ser	Serina
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
SOD2	Mangans-superóxido dismutase mitocondrial
SP1	Proteína de especificidade 1 (<i>Specificity protein 1</i>)
STA	Síndrome torácica aguda
T	Timina
T3	Hormônio tireoidiano triiodotironina
TA	Temperatura de anelamento
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLRs	Receptores do tipo Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TRPV5	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5</i>
Val	Valina
VCAM-1	Molécula de adesão a célula vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio
VDR	Receptor de vitamina D nuclear
VitD	25(OH) Vitamina D

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ε	Épsilon
γ	Gama
ψ	Psi
χ^2	Quiquadrado (<i>chi square</i>)
ζ	Zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	HEMOGLOBINA	21
1.2	HEMOGLOBINOPATIA SC.....	23
1.3	FATORES GENÉTICOS MODULADORES DA DOENÇA FALCIFORME.....	24
1.4	O GENE <i>KLOTHO</i> E SUA EXPRESSÃO	26
1.5	A PROTEÍNA <i>KLOTHO</i>	27
1.6	FUNÇÕES DA PROTEÍNA <i>KLOTHO</i>	28
1.6.1	Regulação do eixo endócrino osso-rim.....	28
1.6.2	Regulação de canais iônicos	29
1.6.3	Regulação de mecanismos de sinalização insulina/ fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1).....	30
1.6.4	Atuação sobre o endotélio vascular	30
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVO GERAL	32
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	CASUÍSTICA.....	33
5	MÉTODOS.....	34
5.1	COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	34
5.2	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	34
5.3	CONFIRMAÇÃO DO PERFIL DE HEMOGLOBINA.....	36
5.4	CONTAGEM DE RETICULÓCITOS	36
5.5	DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	36
5.6	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FERRITINA, HAPTOGLOBINA, A1AT, ASLO E PCRe	37
5.7	INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE 25(OH)VITAMINA D E PARATORMÔNIO	37
5.8	ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR	37
5.8.1	Extração do DNA genômico.....	37
5.8.2	Investigação de SNPs no gene <i>Kl</i>	37
5.8.3	Determinação dos haplótipos relacionados ao grupo de genes da globina β	39
5.9	COLETA DOS DADOS CLÍNICOS	42

5.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
6	RESULTADOS	44
6.1	FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE <i>K1</i> NOS INDIVÍDUOS HbSC E COMPARAÇÕES ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS.....	48
6.2	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE POTÁSSIO EM INDIVÍDUOS HbSC	51
6.3	ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CÁLCIO NOS INDIVÍDUOS HbSC.....	61
6.4	PERFIL DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FÓSFORO EM INDIVÍDUOS HbSC.....	64
6.5	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM INDIVÍDUOS HbSC.....	72
6.6	ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PARATORMÔNIO EM INDIVÍDUOS HbSC.....	78
6.7	ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS DOS GENES DA GLOBINA β EM INDIVÍDUOS HbSC.....	84
7	DISCUSSÃO	85
8	CONCLUSÕES.....	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
	APÊNDICES	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEMOGLOBINA

A molécula de hemoglobina (Hb) possui estrutura glomerular tetramérica, sendo o maior constituinte proteico dos eritrócitos. A Hb é composta por dois pares de cadeias de globinas distintas, sendo um dos pares de cadeias alfa (alfa- α e zeta- ζ) e o outro de cadeias não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ ou épsilon- ϵ), cada uma contendo um grupo heme, que é formado pelo grupamento prostético denominado protoporfirina IX mais o átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{+2}). Os átomos de ferro têm a capacidade de se ligar a moléculas de oxigênio, que são conduzidas aos tecidos pela circulação sanguínea (CLARKE, 2000; GALIZA NETO, 2003).

Em humanos, os genes que codificam a cadeia alfa localizam-se no cromossomo 16, ao passo que no cromossomo 11 estão localizados os genes que codificam as cadeias não-alfa (**Figura 1**). A supressão e ativação gênica que ocorrem durante o desenvolvimento ontogênico humano compreendem alterações no decorrer do desenvolvimento embrionário, fetal e adulto que determinam as diferentes combinações destas cadeias globinas. Na fase embrionária, até o terceiro mês de gestação, são encontradas as hemoglobinas Gower-1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e Gower-2 ($\alpha_2\epsilon_2$), sendo que neste período ocorre a expressão dos genes que codificam estas cadeias. Ainda na fase intrauterina ocorre produção maior das cadeias α e γ , que se combinam para formar a hemoglobina fetal - HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Após os seis primeiros meses de vida, as cadeias γ passam a ser substituídas pela cadeia β , que origina a HbA1 ($\alpha_2\beta_2$), a forma predominante, em torno de 95% nos indivíduos adultos, embora na fase adulta ainda sejam encontradas concentrações reduzidas da HbF, em torno de 2%. A produção das cadeias δ se inicia na 25ª semana de gestação, conduzindo a síntese da HbA2 ($\alpha_2\delta_2$), que permanece em concentrações reduzidas de até 3,5% na fase adulta (CLARKE, 2000; GALIZA NETO, 2003; HIGGS *et al.*, 2012).

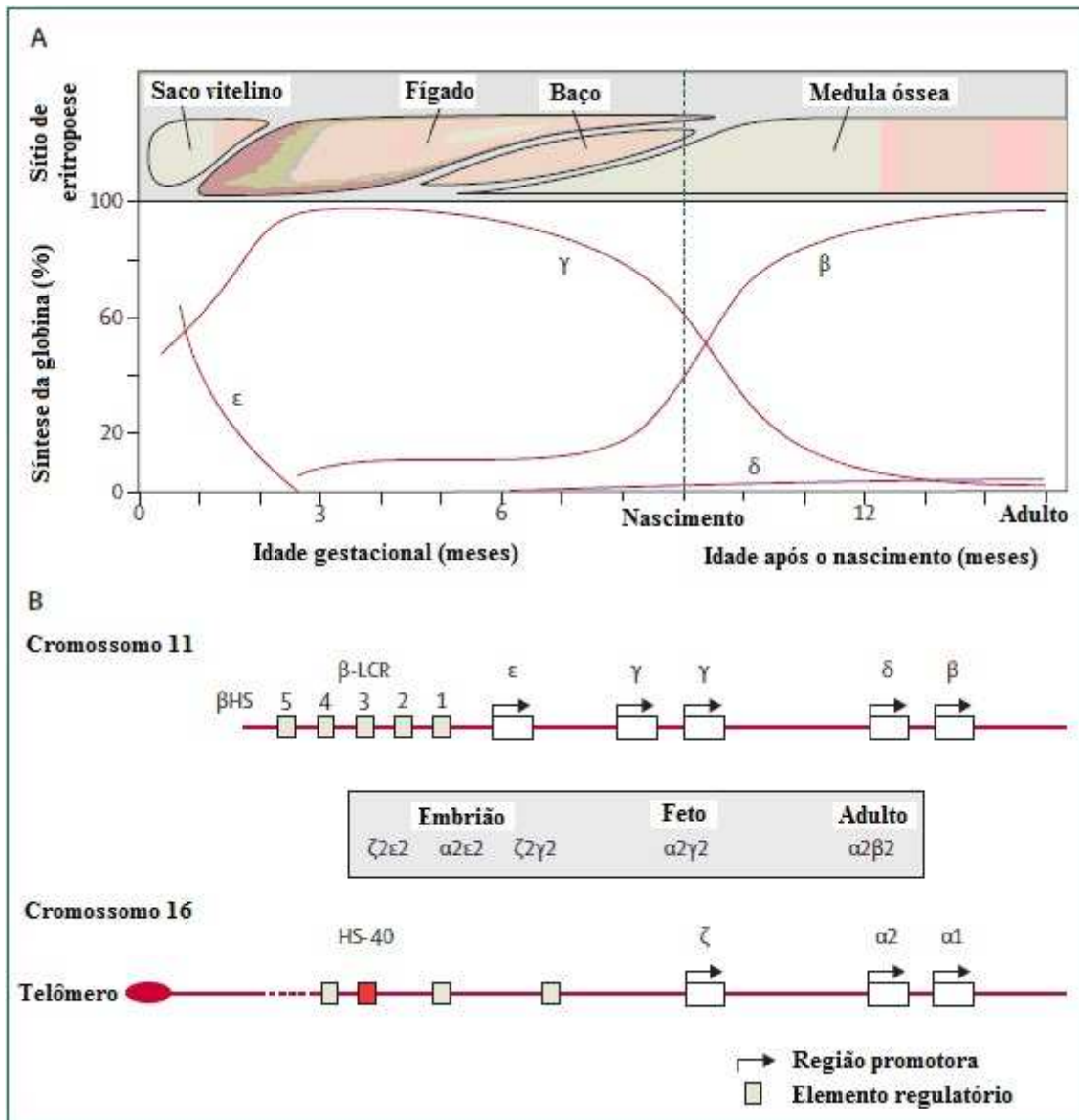


Figura 1: Expressão normal das cadeias de globinas. (A) Sítios de eritropoese conforme o estágio de desenvolvimento, com os respectivos níveis de expressão da globina nos períodos embrionário, fetal e adulto. (B) Representação dos genes responsáveis pela síntese das cadeias de globinas alfa e não-alfa, com os tipos de hemoglobinas produzidos em cada fase do desenvolvimento ontogênico humano. HS = principal elemento regulador de ativação. β -LCR = região de controle do locus- β . (adaptado de HIGGS *et al.*, 2012).

As mutações em genes da globina que levam à substituição de aminoácidos nas cadeias globínicas ocasionam a formação de Hbs variantes, formadas por estruturas secundárias e terciárias distintas daquelas encontradas nas formas normais (CLARKE, 2000). A substituição de adenina por timina ($\underline{GAG} \rightarrow \underline{GTG}$) no gene beta (*HBB*) da globina, com consequente inserção do aminoácido valina (Val) no lugar do ácido glutâmico (Glu) na cadeia polipeptídica beta ($\beta^{\text{glu}^6\text{val}}$), propicia a formação da Hb variante S (HbS), ao passo que a substituição de guanina por adenina no gene *HBB* ($\underline{GAG} \rightarrow \underline{AAG}$) leva à substituição de ácido glutâmico (Glu) por lisina (Lys) na cadeia polipeptídica beta ($\beta^{\text{glu}^6\text{lys}}$), com formação da

Hb variante C (HbC). Essas alterações são a base para os fenômenos de polimerização da HbS na sua forma desoxigenada e da cristalização da HbC dentro dos eritrócitos (LAWRENCE *et al.*, 1997). A polimerização da HbS promove a deformação eritrocitária, bem como a ativação de leucócitos, plaquetas e células endoteliais que contribuem para a ocorrência de eventos vaso-oclusivos e redução do suprimento sanguíneo para os tecidos posteriores ao local ocluído. Somado a isto, os eventos de hemólise ocorridos mediante a falcização favorecem o aumento nas concentrações de Hb livre no plasma, bem como de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais consomem o óxido nítrico (ON), importante vasodilatador. Além disso, o substrato para a síntese de ON, a L-arginina, encontra-se diminuído nestes indivíduos, devido ao seu consumo pela arginase sérica, uma enzima que converte L-arginina em ornitina e uréia, e que se encontra elevada nestes indivíduos. O desfecho deste processo traduz-se em crises dolorosas, complicações respiratórias e danos a órgãos variados (CHIANG, 2005; MORRIS *et al.*, 2005). Por sua vez, a HbC oxigenada gera agregados amorfos que levam à formação de cristais tetragonais, os quais diferem da grande variedade de agregados formados pela HbC desoxigenada (NAGEL *et al.*, 2003).

A predominância das Hbs variantes HbS e HbC no Brasil, somado à origem africana da mutação que origina a HbC, reforçam as evidências da participação importante do negro na formação da população brasileira (LAWRENCE *et al.*, 1997; AIGNER *et al.*, 2006). Situações nas quais ocorre a presença da HbS, como na homozigose (genótipo HbSS → Anemia Falciforme [AF]) ou em combinação com outra Hb variante ou com Hbs provenientes de defeitos de síntese, são conhecidas como Doença Falciforme (DF). Neste grupo estão incluídas a Hemoglobinopatia SC ou Doença SC (HbSC), condição onde os indivíduos possuem alterações clínicas, porém menos graves ao serem comparadas às da AF (NAGEL *et al.*, 2003), e cuja prevalência na cidade de Salvador-Bahia é de 0,9% (ADORNO, *et al.*, 2005).

1.2 HEMOGLOBINOPATIA SC

A patologia induzida pela HbC deve-se à sua capacidade de promover a desidratação do eritrócito e a formação de cristais intracelulares. Sobretudo, pacientes com genótipo HbCC (homozigotos para HbC) apresentam anemia hemolítica intermediária, e os pacientes com genótipo HbAC (heterozigotos para HbC) não apresentam patologia significativa, sendo assintomáticos. Em contrapartida, na HbSC, na qual coexistem concentrações iguais de HbS e

HbC, a HbC induz as propriedades patogênicas da HbS, sendo, portanto, de importância clínica na doença (NAGEL *et al.*, 2003).

A fisiopatologia clínica diferenciada da HbSC, quando comparada à dos heterozigotos para a HbS ou traço falciforme (HbAS), que assim como na HbSC apresenta concentrações muito mais baixas de HbS do que os indivíduos com AF, deve-se ao fato de que na HbSC as concentrações diminuídas da HbS não atenuam os defeitos induzidos pela polimerização, fato que ocorre nos portadores HbAS, que não possuem sintomas clínicos. Isto se deve à desidratação das células contendo HbC, ocasionada pela presença do co-transporte de potássio (K^+) e cloro (Cl^-) ativado. Com isto, eleva-se o efluxo de K^+ , bem como a perda de água. Estas hemácias também exibem alteração reduzida do volume celular em resposta à variação da osmolaridade do meio, provavelmente em decorrência da elevação do efluxo de K^+ volume-estimulado, que conduz à desidratação. Isto eleva a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) uniformemente em toda a população eritrocitária, o que contribui para o quadro clínico similar ao da AF (ROMERO *et al.*, 2004), já que induz a polimerização da HbS, colaborando de forma expressiva, portanto, com a fisiopatologia da doença. Alguns estudos têm demonstrado também a capacidade da HbS em acelerar a cristalização da HbC (LAWRENCE *et al.*, 1997), colaborando de forma negativa para a clínica dos pacientes com genótipo HbSC. A reidratação destas hemácias reverte estes eventos.

Todas as complicações encontradas em pacientes com AF ocorrem também nos indivíduos com genótipo HbSC, sendo que algumas ocorrem em frequência menor nestes pacientes, ou até mesmo de forma mais tardia. Isto inclui a hemólise menos intensa, com anemias mais brandas e complicações da hemólise menos frequentes ou graves. É comum a presença de osteonecrose e retinopatia proliferativa, sendo esta última mais prevalente que nos indivíduos com AF. A mortalidade por síndrome torácica aguda (STA) pode estar aumentada e os episódios de dor são também frequentes, com a expectativa de vida menor do que em populações controle. O crescimento nos pacientes HbSC é atrasado, embora menos do que nos indivíduos AF, porém não parece afetar a altura, o peso e a idade óssea (AQUINO *et al.*, 1994; NAGEL *et al.*, 2003).

1.3 FATORES GENÉTICOS MODULADORES DA DOENÇA FALCIFORME

A grande variabilidade clínica encontrada nos indivíduos acometidos pela DF diz respeito à atuação de genes moduladores interferentes nos componentes vascular e inflamatório da doença, sobretudo a interação entre tais genes e entre estes e seu

microambiente (SEBASTIANI *et al.*, 2010). Alguns fatores, a exemplo da HbF e os haplótipos ligados aos genes da globina β , são preditores de agravos nestes indivíduos.

A presença da HbF nos eritrócitos de indivíduos com DF inibe a polimerização da HbS, com redução da sua concentração. Além disso, o híbrido formado entre os dois tipos de Hb ($\alpha 2\beta^S\gamma$) não pode se unir ao polímero de HbS. Entretanto, os níveis de HbF variam entre os eritrócitos em um mesmo indivíduo e, quanto maiores os níveis de HbF no eritrócito, maior será, portanto, a proteção conferida. Evidencia-se então a sua importância na prevenção de um quadro clínico mais grave a partir do fato de que alguns determinantes genéticos relacionados à gravidade maior da doença interferem nos níveis da HbF (AKINSHEYE *et al.*, 2011).

Os haplótipos ligados ao gene da globina β , por sua vez, são determinados a partir da utilização de endonucleases de restrição (ER) que clivam sítios específicos no gene, possibilitando a formação de grupos referentes aos sítios clivados. Estas combinações foram nomeadas conforme a região geográfica africana na qual elas se originaram. Desta forma, compõem os haplótipos do grupo Senegal (SEN), Benin (BEN), Bantu ou República Central Africana (CAR), Camarões (CAM), além do Atípico (Atp), o qual corresponde às combinações de sítios de restrição que não assumem o padrão de um dos demais grupos. A determinação destes haplótipos pode auxiliar no entendimento acerca da variabilidade clínica dos indivíduos com DF, já que os níveis de HbF variam conforme o haplótipo que o indivíduo apresenta, como observado nos tipos SEN e CAM, os quais apresentam concentrações maiores desta Hb e, portanto, gravidade clínica menor. Por sua vez, a gravidade maior ocorre nos indivíduos com haplótipo CAR, seguido do BEN, que possuem quadro clínico intermediário (GONÇALVES *et al.*, 2003; STEINBERG, 2005; SANKARAN, 2013).

Entretanto, outros trabalhos apontam para a atividade moduladora da DF por outros genes, como descrito na associação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no gene *Klotho* (*Kl*) com subfenótipos de indivíduos com AF. Indivíduos com AF, com ou sem talassemia α , com desenvolvimento de osteonecrose de quadril e/ou ombro, apresentaram 10 SNPs no gene *Kl* associados significativamente com este subfenótipo (BALDWIN *et al.*, 2005). Além disso, dois SNPs já foram associados ao priapismo (NOLAN *et al.*, 2005) e três com úlceras de perna (NOLAN *et al.*, 2006). Todas estas associações podem ter sido subestimadas, tendo em vista que os indivíduos dos respectivos grupos controle poderiam ainda, futuramente, desenvolver tais subfenótipos.

1.4 O GENE *KLOTHO* E SUA EXPRESSÃO

O gene *Kl* está localizado no cromossomo 13q12 em humanos (NG_011485.1), sendo composto por 50 quilobases (Kb) dispostos em cinco éxons. Em sua região promotora ocorrem ilhas CpG (MATSUMURA *et al.*, 1998), e estão ausentes sequências de consenso do tipo TATA ou elementos cis-actin CAAT. Existem, no entanto, quatro sítios de ligação para o fator de transcrição da proteína de especificidade 1 (SP1) (SHIRAKI-IIDA *et al.*, 1998).

A expressão do gene *Kl* ocorre, predominantemente, nos túbulos contorcidos distais nos rins e no plexo coróide no cérebro. Órgãos endócrinos (pituitária, paratireóide, ovários, testículos e placenta), bem como o coração e as células β -pancreáticas, também expressam o gene *Kl* (KURO-O *et al.*, 1997; MATSUMURA *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2004; TAKESHITA *et al.*, 2004; BEN-DOV *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2010). A expressão baixa do gene *Kl* ocorre no músculo esquelético, bexiga urinária, aorta, cólon, intestino, glândula tireóide e próstata (KURO-O *et al.*, 1997; OHYAMA *et al.*, 1998).

O gene *Kl* é expresso pronunciadamente após o nascimento, sendo afetado por condições de estresse inflamatório agudo, bem como estresse cardiovascular ou metabólico sustentado (OHYAMA *et al.*, 1998). Situações patológicas em ratos, tais como a hipertensão prolongada, diabetes mellitus, hiperlipidemia e insuficiência renal crônica (IRC), as quais cursam com a manutenção de estresse circulatório, levam à redução da expressão renal deste gene (AIZAWA *et al.*, 1998).

Em humanos, ocorre algo semelhante na IRC, no que diz respeito à expressão do *Kl* mRNA, o que resulta na depleção nos níveis de seu produto protéico, conjugada à diminuição no número de néfrons e à perda de detecção da proteína Klotho nas células de túbulos contorcidos mediante a utilização de anticorpos monoclonais. Esta expressão reduzida reflete, portanto, a perda em número ou apenas da função de células que expressam a proteína Klotho, e pode estar relacionado à fisiopatologia da IRC, refletida nas lesões cardiovasculares, arteriosclerose, calcificação arterial e miocárdial, bem como na disfunção endotelial. Assim como nos animais *Kl/Kl*, a IRC é caracterizada pela presença de hiperfosfatemia, que se relaciona com risco maior de mortalidade (KOH *et al.*, 2001).

Por outro lado, o hormônio tireoidiano triiodotironina (T3) foi descrito como um potencializador da expressão do mRNA codificador da forma transmembrana da proteína Klotho em adipócitos em diferenciação. Como não há aumento na expressão de mRNA para a forma secretada da proteína Klotho, sugere-se que o T3 pode afetar o *splicing* no mRNA do *Kl*. Sobretudo, pelo fato de o tecido adiposo subcutâneo ser quase ausente em animais *Kl/Kl*,

sugere-se que a proteína Klotho influencie a diferenciação de adipócitos (MIZUNO *et al.*, 2001).

1.5 A PROTEÍNA KLOTHO

O gene *Kl* possui dois transcritos, um que codifica uma proteína transmembrana unipasso e outro para a forma secretada da proteína Klotho, resultantes do *splicing* alternativo do mRNA no terceiro éxon. Quando não ocorre o *splicing* nesta região, origina-se a forma secretada, uma vez que o transcrito conterá a inserção de 50 pares de bases (pb) que abriga o códon de parada TAG (dois nucleotídeos da inserção – TA – e o primeiro nucleotídeo do quarto éxon – G). O transcrito do qual provém a proteína Klotho transmembrana contém o quadro de leitura da proteína de 3.036 pb (1.012 aminoácidos em humanos), e codifica o produto protéico composto pela sequência de sinal N-terminal, um domínio extracelular com duas repetições internas (KL1 e KL2), que compartilham certa homologia com as glicosidases, as quais hidrolisam as ligações β -glicosídicas em sacarídeos, glicoproteínas e glicopeptídeos e que possui um trecho curto de aminoácidos básicos Lys-Lys-Arg-Lys, caracterizados como possíveis sítios para clivagem proteolítica. Além disso, ocorre a existência do domínio transmembrana e de um pequeno domínio intracelular, sendo esta composição a mesma em camundongos e humanos. Em contrapartida, o transcrito do qual se traduz a forma secretada da proteína Klotho resulta em um quadro de leitura da proteína de 1.647 pb, cujo produto é uma proteína de 549 aminoácidos com apenas uma sequência de sinal N-terminal, e um domínio extracelular com apenas uma repetição interna (KL1). Entre estas duas formas protéicas, a secretada prevalece em tecidos humanos (MATSUMURA *et al.*, 1998; SHIRAKI-IIDA *et al.*, 1998). Existe ainda outra forma secretada, originada a partir da clivagem da forma transmembrana por α e β -secretases, com o dobro do comprimento da proteína secretada proveniente de *splicing* alternativo (CHEN *et al.*, 2007; BLOCH *et al.*, 2009).

As atuações da proteína Klotho se estendem além dos tecidos que expressam seu gene codificante, funcionando como fator humoral. Esta proteína pode atingir a circulação sistêmica por meio de suas frações secretadas, liberadas no espaço extracelular e, posteriormente, na circulação. Adicionalmente, a proteína Klotho é expressa difusamente no citoplasma e, principalmente, no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, nos quais as formas maduras e imaturas da proteína podem se ligar aos canais de Na^+ , K^+ -ATPase, formando um complexo passível de ser recrutado para a superfície celular. Uma vez na

superfície, tal proteína pode ser clivada e liberada na circulação. Como resultado, a proteína solúvel circula em fluidos corporais, tais como o sangue, a urina e o líquido cefalorraquidiano (IMURA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2007).

1.6 FUNÇÕES DA PROTEÍNA KLOTHO

1.6.1 Regulação do eixo endócrino osso-rim

A proteína Klotho transmembrana atua como co-receptor para o fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF23), um hormônio derivado do osso que atua nos rins inibindo a reabsorção de fosfato e a biossíntese de vitamina D (importante para a absorção do fosfato da dieta nos intestinos). Níveis elevados de fosfato e/ou vitamina D são capazes de induzir a expressão de FGF23 em osteócitos. A vitamina D se liga ao receptor de vitamina D nuclear (VDR), com indução da heterodimerização com outro receptor nuclear, o receptor retinóide X (RXR). O heterodímero VDRRXR liga-se, então, à região promotora do gene *FGF23*, ativando a sua expressão. Por sua vez, na célula tubular renal, a proteína Klotho transmembrana se associa ao receptor de FGF23 (FGFR), intensificando sua afinidade pelo FGF23. Ao haver o reconhecimento entre o FGF23 e o complexo Klotho-FGFR, ocorre um bloqueio da reabsorção de fosfato pelo co-transportador de sódio-fosfato tipo-2a (NaPi-2a) expresso na membrana apical das células tubulares proximais dos rins. Tal reconhecimento inibe também a expressão do gene codificador para a 1 α -hidroxilase (*Cyp27b1*), e a 1 α -hidroxilase, junto com a 25(OH) vitamina D₃, participa da síntese renal da forma ativa da vitamina D, a 1,25(OH)₂ vitamina D₃, além de ativar a expressão do gene que expressa a 24-hidroxilase (*Cyp24*), fator responsável pela inativação da 1 α -hidroxilase. Como resultado, há a redução dos níveis séricos de 1,25(OH)₂ vitamina D₃. Estes mecanismos são essenciais para a homeostase da vitamina, prevenindo a ocorrência de hipervitaminose D (SHIMADA *et al.*, 2004; KUROSU *et al.*, 2006; URAKAWA *et al.*, 2006; NAKATANI *et al.*, 2009). Tem sido também demonstrado que a administração de 1,25(OH)₂ vitamina D₃ induz a expressão renal de *Kl*, o que reforça o mecanismo integrado entre FGF23 e Klotho neste eixo (TSUJIKAWA *et al.*, 2003).

As perturbações nestas vias de regulação que envolvem o FGF23 ou o Klotho, além de levarem à hiperfosfatemia e hipervitaminose D, também conduzem ao estado de hipercalcemia, visto que a vitamina D promove não só a absorção de fosfato nos intestinos, por intermédio do co-transportador de sódio-fosfato tipo-2b (NaPi-2b), como também a de

cálcio. Diante de uma hipervitaminose D, a absorção intestinal de cálcio estará, portanto, aumentada (YOSHIDA *et al.*, 2002).

Adicionalmente, observações acerca da atividade fosfatúrica de Klotho em camundongos que não expressavam *FGF23* revelaram uma atividade fosfatúrica adicional própria da proteína Klotho secretada, independente de FGF23. O que ocorre é a atividade de glicosidase da proteína sobre um substrato ainda desconhecido, presente na borda em escova das células tubulares proximais dos rins, e esta modificação é acompanhada pela clivagem proteolítica, etapa que ocorre, mas não é necessária para a inativação do transportador, e internalização dos co-transportadores NaPi-2a (HU *et al.*, 2010).

A proteína Klotho pode também inibir o transporte de fosfato nas células da musculatura lisa vascular, por meio de transportadores de NaPi de classe 3 – Pit-1 e Pit-2 –, prevenindo eventos de calcificação vascular, visto que um influxo excessivo de fosfato nestas células favorece a cascata de eventos responsáveis pela mineralização de cálcio e fosfato em seu interior (LAU *et al.*, 2010).

1.6.2 Regulação de canais iônicos

A proteína Klotho secretada regula outros canais de íons, como o *transient receptor potential cation channel*, subfamília V, membro 5 (TRPV5), um canal de cálcio (Ca^{2+}) expresso na face apical das células tubulares distais renais e é primariamente responsável pela entrada de Ca^{2+} durante a sua reabsorção transepitelial nos rins. A proteína Klotho secretada inibe a internalização dos TRPV5, devido à sua atividade de sialidase, pela qual ocorre a remoção do resíduo de ácido siálico terminal nos glicanos contidos nestes receptores, favorecendo sua interação com a galectina-1, uma lecitina abundante na matriz extracelular. O desfecho é o acúmulo do receptor na superfície celular, elevando com isto o influxo e a reabsorção renal do Ca^{2+} (CHANG *et al.*, 2005; CHA *et al.*, 2008). Este mesmo mecanismo de retenção do canal iônico na superfície celular ocorre durante a regulação dos canais de K^+ da medula renal externa (ROMK1), resultando em um aumento do número de ROMK1 na membrana plasmática das células tubulares renais, com elevação da secreção de K^+ na urina (CHA *et al.*, 2009).

1.6.3 Regulação de mecanismos de sinalização insulina/ fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1)

A proteína Klotho está associada com a regulação de mecanismos de sinalização insulina/ IGF-1, suprimindo o estresse oxidativo. Os fatores de transcrição nucleares conhecidos como *mammalian forkhead box O* (FOXO) são fatores que se ligam diretamente a promotores de enzimas antioxidantes, tais como a catalase e a manganês-superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), induzindo a expressão destas enzimas. Em consequência, ocorre o aumento da remoção de EROs, conferindo resistência ao estresse oxidativo. Estes FOXOs são regulados negativamente pela sinalização insulina/IGF-1 ativada, a qual promove a fosforilação e ativação de uma serina-treonina cinase Akt, que tem a capacidade de fosforilar o FOXO, induzindo, por este mecanismo, a sua exclusão do núcleo e inativação. A proteína Klotho atua inibindo a sinalização insulina/IGF-1, proporcionando um decréscimo na fosforilação dos FOXOs, elevando a expressão de SOD2, minimizando, portanto, o estresse oxidativo (YAMAMOTO *et al.*, 2005).

1.6.4 Atuação sobre o endotélio vascular

A proteína Klotho secretada exerce efeitos anti-apoptótico e anti-envelhecimento sobre as células do endotélio vascular. O endotélio vascular, a partir da liberação de ON em resposta a agonistas específicos, tal como a acetilcolina, apresenta papel importante na manutenção do tônus vascular. Tem-se demonstrado, entretanto, que deficiências no gene *Kl* atenuam significativamente a vasodilatação endotélio-dependente da aorta e arteríolas em resposta à acetilcolina, bem como reduz a excreção urinária de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (SAITO *et al.*, 1998; NAGAI *et al.*, 2000).

Há evidências de que o Klotho, nas formas secretada e ligada à membrana, possa regular positivamente a produção de ON, protegendo, portanto, contra a disfunção endotelial, embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos. Acredita-se que a deficiência do gene *Kl* possa regular negativamente a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), decrescendo a síntese deste vasodilatador (NAGAI *et al.*, 2000; SAITO *et al.*, 2000; MASUDA *et al.*, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Os pacientes que compuseram a casuística deste estudo apresentam as Hbs variantes mais frequentes no Brasil, a HbS e a HbC, ambas com prevalência elevada no estado da Bahia. Eles apresentam entre si, assim como ocorre com os indivíduos com AF, grande variabilidade em suas manifestações clínicas, com provável participação de interações epigenéticas, além das alterações que conduzem à formação das Hbs variantes, na modulação destas doenças. As manifestações clínicas que ocorrem na HbSC são tão importantes quanto aquelas encontradas na AF, embora elas possam ocorrer com uma frequência menor ou de forma mais tardia, quando comparado com a AF (LAWRENCE *et al.*, 1997; AIGNER *et al.*, 2006; SEBASTIANI *et al.*, 2010). Sobretudo, a maioria dos estudos envolvendo as DFs contempla os indivíduos com genótipo HbSS, em detrimento da HbSC.

A proteína Klotho, por sua vez, atua de forma humoral em diversos locais do organismo, possuindo atividade fosfatúrica e reduzindo a síntese de $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D₃, regulando a quantidade de canais iônicos na superfície celular, além de atuar como fator anti-envelhecimento e anti-apoptótico, reduzir o estresse oxidativo e induzir a produção de ON. Alguns SNPs no gene *Klotho* têm sido associados a subfenótipos de indivíduos com AF (BALDWIN *et al.*, 2005; NOLAN *et al.*, 2005; NOLAN *et al.*, 2006), mas por divergências metodológicas a reprodutibilidade destes dados não tem ocorrido. Tendo em vista o envolvimento endotelial da proteína Klotho, bem como os conhecimentos acerca da fisiopatologia da DF, que possui como característica clínica importante os fenômenos vaso-oclusivos, é imprescindível a realização de estudos que possam identificar marcadores genéticos de risco nestes indivíduos, permitindo uma intervenção terapêutica precoce e mais efetiva.

Portanto, o entendimento de mecanismos genéticos envolvidos na variabilidade de apresentações fenotípicas da DF é de grande importância, dado o fato de que pode fornecer ferramentas para uma terapêutica mais individualizada, que seja capaz de contribuir para o controle destes fenômenos, com redução no número de internações, melhoria no suporte clínico e na qualidade de vida destes indivíduos.

3 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de SNPs no gene *Kl* e avaliar a influência nos níveis séricos de K^+ , Ca^{2+} , fósforo, vitamina D (VitD) e paratormônio (PTH) em indivíduos com hemoglobinopatia SC, associando-os com os marcadores de avaliação clínica nestes indivíduos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar a frequência de SNPs no gene *Kl* em pacientes com genótipo HbSC;
- Avaliar os valores hematológicos, índices hematimétricos, marcadores de hemólise, renais e hepáticos, parâmetros relacionados ao perfil lipídico, e marcadores inflamatórios, bem como determinar a frequência de haplótipos ligados ao gene da globina β nestes indivíduos;
- Determinar os níveis séricos de K^+ , Ca^{2+} e fósforo, assim como de vitamina D (VitD) e paratormônio (PTH), relacionando-os com as demais variáveis obtidas;
- Estabelecer associações entre polimorfismos no gene *Kl* e os marcadores investigados, bem como com as complicações clínicas nestes pacientes.

4 CASUÍSTICA

O presente projeto é parte do projeto de pesquisa intitulado “Modulação genética na Anemia Falciforme”, submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), segundo o parecer nº 202/2007, processo nº 25000.147632/2006-61.

Este trabalho consistiu em um estudo de corte transversal, cuja casuística foi composta por 113 indivíduos com diagnóstico de doença SC, com idade média de 15,72 (\pm 11,72) anos, atendidos no ambulatório de Hematologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (HEMOBA/SESAB), Salvador-Ba. Entre estes indivíduos, 55 (50%) eram do sexo feminino. A participação dos pacientes ocorreu mediante a explicação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes e responsáveis legais, no caso de pacientes menores de 18 anos (**Apêndices I e II**). No ato da entrevista, os indivíduos e/ou seus responsáveis responderam ao questionário de inquérito epidemiológico (**Apêndice III**). A inclusão dos pacientes no estudo se deu mediante a confirmação do diagnóstico de HbSC e a sua apresentação em estado estável (eles compareciam ao ambulatório apenas para consulta periódica) no momento da coleta. Em contrapartida, foram excluídos do estudo aqueles que não tiveram a confirmação do perfil de Hb, ou que estivessem em uso de hidroxiuréia ou hemoderivados.

As análises estatísticas também foram realizadas entre os pacientes com e sem SNPs no gene *Kl*, sendo comparados quanto aos parâmetros avaliados nas amostras dos indivíduos e quanto aos dados clínicos obtidos nos prontuários.

Os dados prévios sobre a frequência de SNPs no gene *Kl* em pacientes com AF e controles possibilitaram a realização do cálculo do número mínimo de indivíduos necessários para a investigação do polimorfismo, com intervalo de confiança (IC) de 95% e poder de associação de 80%, a partir da utilização da calculadora estatística (ESTATCAL) do EPI INFO versão 6.04. Para tal, foi levado em conta a frequência de 36% no grupo de indivíduos com DF expostos a determinado evento e de 10 % nos indivíduos com a doença, mas sem a exposição ao evento ou indivíduos do grupo controle, sendo necessários por isto, no mínimo, 94 indivíduos.

Todos os experimentos realizados seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005, seguindo as normas técnicas existentes no Manual de Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes da Fiocruz (Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ – Ministério da Saúde, 2005).

5 MÉTODOS

Neste estudo, foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas e moleculares, com análise complementar retrospectiva dos dados clínicos em prontuários médicos. Foram avaliados parâmetros hematológicos, marcadores de hemólise, de função renal e hepática, parâmetros relacionados ao perfil lipídico, e marcadores inflamatórios, bem como foram determinados os níveis séricos de K^+ , Ca^{2+} , fósforo, VitD e PTH, além de marcadores moleculares. Os marcadores hematológicos, de hemólise, de função renal e hepática, marcadores de perfil lipídico e inflamatórios e os níveis de Ca^{2+} , K^+ e fósforo foram dosados no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (LACTFAR-UFBA). As análises do PTH e da VitD foram realizadas no Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (HUPES-UFBA). As análises de biologia molecular (determinação dos haplótipos do gene da globina β e de SNPs no gene *KI*) foram realizadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Bahia (**Figura 2**).

5.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE:

Foram coletados 5mL de sangue venoso em anticoagulante (ácido etilenodiaminotetracético di-sódico - EDTA), na concentração de 1,5 mg/mL (DACIE & LEWIS, 1984), para a realização das determinações hematológicas, perfil de Hb e extração do DNA genômico para as análises de biologia molecular. Outros 10mL de sangue venoso foram coletados sem aditivo para a obtenção do soro para as demais determinações. Alíquotas de soro foram armazenadas em freezer a $-70^{\circ}C$ para as dosagens não realizadas de imediato.

5.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS:

Os valores hematológicos (eritograma, leucograma e contagem de plaquetas) e índices hematimétricos (volume corpuscular médio [VCM], hemoglobina corpuscular média [HCM] e concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM]) foram determinados em contador eletrônico de células (ABX Pentra 80 - HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR). A análise morfológica das hemácias ocorreu pela observação microscópica dos

esfregaços sanguíneos confeccionados no momento da coleta e corados pela técnica de *Wright*.

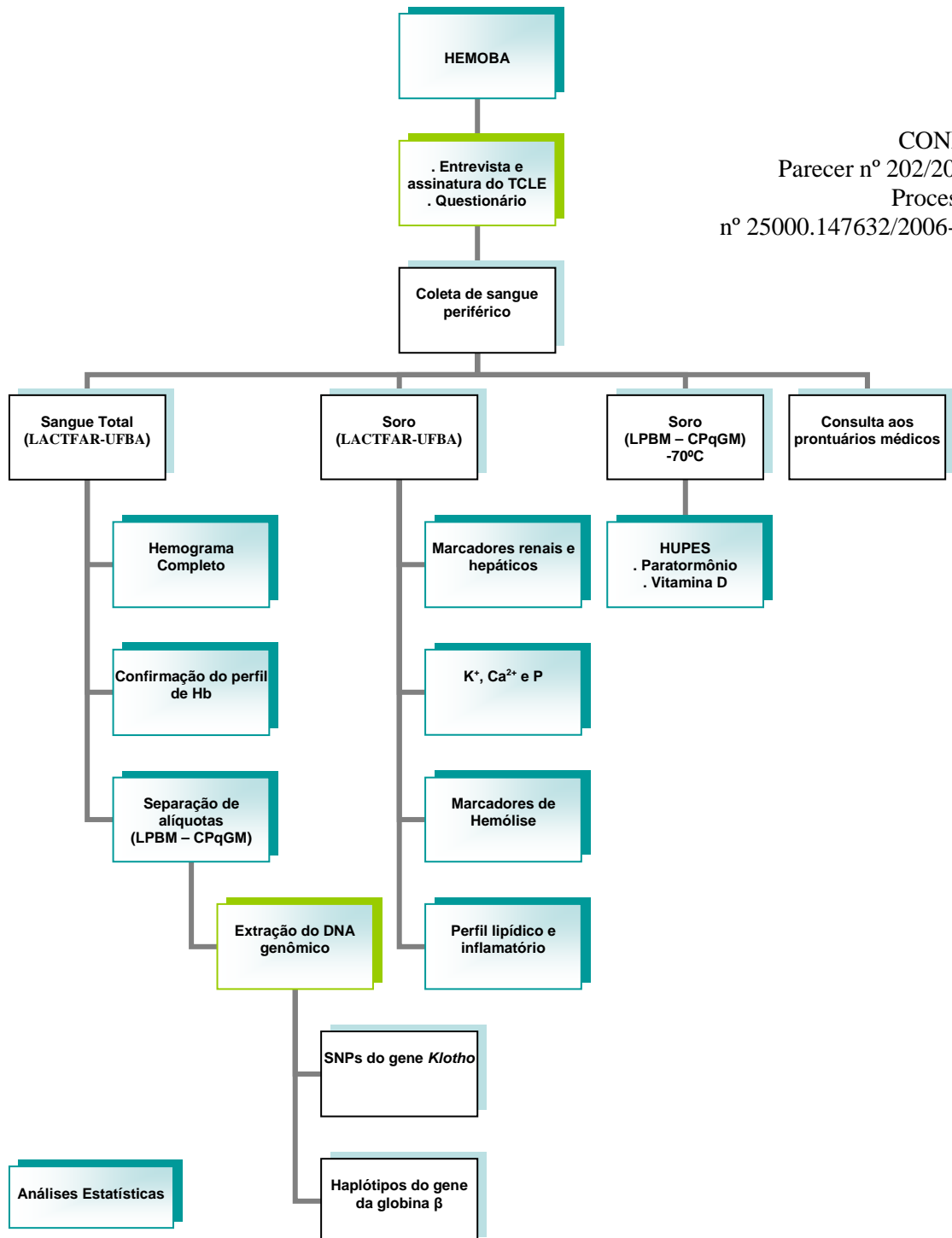


Figura 2: Fluxograma do modelo experimental.

5.3 CONFIRMAÇÃO DO PERFIL DE HEMOGLOBINA:

A confirmação e a quantificação do perfil de Hbs foram realizadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), pelo princípio de troca iônica, utilizando-se o aparelho BIO-RAD, modelo VARIANT™ (Califórnia, USA). Desta forma, os indivíduos foram triados quanto ao genótipo de Hbs, sendo incluídos no estudo apenas os que apresentavam perfil HbSC, além de obtermos os percentuais de HbS, HbC, HbA1, HbA2 e HbF.

5.4 CONTAGEM DE RETICULÓCITOS:

Para a contagem de reticulócitos, o sangue total foi incubado por 15 minutos na proporção de 1:1 do corante supra-vital azul de cresil brilhante em banho-maria a 37° C. Um esfregaço sanguíneo da mistura foi obtido após a incubação, com contra coloração com o corante *Wright* e observação ao microscópio óptico. Observou-se a percentagem de reticulócitos em relação ao número total de hemácias. Em caso de hematócrito (Ht) diminuído, procedeu-se à correção do número de reticulócitos por meio da fórmula abaixo:

$$\frac{\% \text{ de reticulócitos} \times \text{Ht do paciente}}{45}$$

5.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS:

Foram determinadas as concentrações dos marcadores de perfil lipídico (colesterol total e suas frações e triglicerídeos), desidrogenase láctica (DHL), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL) e gama glutamiltransferase (GGT), bilirrubina total e frações, uréia, creatinina e ácido úrico, proteínas totais (PTs) e frações, ferro, Ca²⁺ e fósforo, pelo método automatizado utilizando o equipamento A25 (BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain). O K⁺ foi determinado por metodologia de eletrodo de íon seletivo (ISE) no equipamento LabMax 240 – LabTest (Labtest, Brasil).

5.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FERRITINA, HAPTOGLOBINA, ALFA 1-ANTITRIPSINA (A1AT), ANTICORPO ANTIESTREPTOLISINA O (ASLO) E PROTEÍNA C-REATIVA (PCRe):

Os níveis séricos de ferritina foram determinados pelo método de quimioluminescência, no equipamento Access2 (Beckman Coulter Inc, CA, EUA). Quanto à haptoglobina, a A1AT, o ASLO e a PCRe, estes foram determinados por nefelometria, no equipamento Image (Beckman Coulter Inc, CA, EUA).

5.7 INVESTIGAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE 25(OH)VITAMINA D (VitD) E PTH:

A VitD foi determinada em amostras de soro dos pacientes, a partir de um imunoenensaio de quimiluminescência competitivo direto – LIAISON® 25 OH vitamin D total, em equipamento LIAISON® (DiaSorin, Itália) conforme instruções do fabricante. Neste mesmo equipamento foi realizada a determinação de PTH, pelo método de quimiluminescência direta do tipo sanduíche – LIAISON® N-TACT® PTH, conforme instruções do fabricante.

5.8 ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR:

5.8.1 Extração do DNA genômico

O isolamento do DNA genômico de leucócitos foi realizado em 200 µL de sangue periférico utilizando-se o método direto *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas por meio do equipamento NanoDrop ND-1000 (ISOGEN LIFE SCIENCE, De Meem, The Netherlands). Em seguida, foram feitas alíquotas de 50µL de cada amostra de DNA em placas de 96 poços, as quais foram lacradas e armazenadas a -20°C até o momento das análises.

5.8.2 Investigação de SNPs no gene *Kl*:

Foram avaliados quatro SNPs no gene *Kl* nas amostras de DNA, conforme demonstrado na **Tabela 1**. A escolha destes quatro SNPs foi realizada a partir das associações

significativas entre os mesmos e subfenótipos da AF em estudos piloto prévios, realizados por STEINBERG e colaboradores.

Tabela 1: Relação e descrição dos SNPs no gene *K1* avaliados no estudo.

SNPs	Tipo de mutação	mRNA		Proteína
		Localização	Alteração	
C_7604792_10 rs1207568	Intergênica – próximo ao gene 5 (substituição → transição G por A)	NA	NA	NA
C_2983036_20 rs9527025	Intragênica missense (substituição → transversão G por C)	Éxon 2 (posição 1117)	TGC >TCC	Cys370Ser
C_592739_10 rs564481	Intragênica sinônima (substituição → transição C por T)	Éxon 4 (posição 1775)	CAC > CAT	His589His
C_592738_20 rs648202	Intragênica sinônima (substituição → transição T por C)	Éxon 4 (posição 2255)	GCT > GCC	Ala749Ala

SNPs = Polimorfismos de nucleotídeos únicos. NA = Não se aplica. Cys = Cisteína. Ser = Serina. His = Histidina. Ala = Alanina.

Para a determinação destes SNPs foi realizada a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em Tempo Real (*Real Time Polymerase Chain Reaction – Real-Time PCR*), com sistema TaqMan (Applied Biosystems, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a análise de cada amostra, a reação continha 9,5 µL de água livre de DNase e RNase, 12 µL do *Master Mix*, 1 µL do *Assay Mix* e 2,5 µL do DNA, formando um volume final de 25 µL. O reagente *Master Mix* é uma mistura contendo solução tampão, cloreto de magnésio (MgCl₂), deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e Taq DNA polimerase. Os *primers* direto e reverso para a amplificação de cada sequência de interesse (**Tabela 2**), bem como as sondas marcadas com os fluoróforos VIC[®] e *fluorescein amidite* (FAM[™]), para a detecção dos alelos selvagem e mutante, respectivamente, faziam parte do *Assay Mix*. Cada reação passou por uma etapa de pré-leitura para a determinação de fluorescência pré-existente à amplificação em *primers* e sondas. Estes valores da pré-leitura foram subtraídos dos valores determinados após a termociclagem. A termociclagem, por sua vez, foi composta por uma etapa inicial de 10 minutos a 95°C, seguido pela etapa de desnaturação de 15 segundos a 92°C e anelamento e extensão por 1 minuto a 60°C, perfazendo um total de 40 ciclos.

5.8.3 Determinação dos haplótipos relacionados ao grupo de genes da globina β :

Os haplótipos foram determinados por reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos (**Tabela 3**), com posterior reação de restrição de polimorfismos por endonucleases de restrição (restriction fragment length polymorphism - RFLP). Os sítios de restrição estudados foram: a posição 5' da região γ^G ; a região γ^G ; a região γ^A ; a região $\psi\beta$ e a posição 3' da região $\psi\beta$ (**Tabela 3**). As condições para as reações de PCR e RFLP encontram-se sumarizadas na **Tabela 4**. A análise dos fragmentos foi realizada através de migração eletroforética em gel de agarose a 2% em tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1X: tris-acetato - 0,04M; EDTA - 0,001M), corado pelo *Syber Green* 1:2.000. A visualização das bandas coradas pelo *Syber Green* foi realizada em transluminador sob luz ultravioleta. A definição dos haplótipos se deu segundo KULOZIK e colaboradores (1986).

Tabela 2: Sequências de *primers* e fluoróforos utilizados para cada SNP nas reações de *Real Time* PCR.

SNPs	Primers	Fluoróforos
rs1207568	GGCAGGATCCCGCCCCCAAGTCGGG (D)	VIC
	AAAGTTGGTCGGCGCCTTTTCTCCC (R)	FAM
rs9527025	GGAAGTGGTCTGACTTTTTTGCTCTTT (D)	VIC
	CTTTGGACCCACCTTGAGTTTTCAA (R)	FAM
rs564481	AGATCGCTTTACTCCAGGAAATGCA (D)	VIC
	GTTACACATTTTCGCTTCTCCCTGG (R)	FAM
rs648202	TCTCCCAAAGGACAAAGAGGTGGC (D)	VIC
	GAGAGAGTTTTGGAATTTGACATTG (R)	FAM

SNPs = Polimorfismos de nucleotídeos únicos. PCR = Reação da Polimerase em Cadeia. D=Direto. R=Reverso. FAM = *Fluorescein amidite*.

Tabela 3: Relação dos *primers* utilizados nas reações de PCR, a localização da região gênica estudada, o tamanho do fragmento gerado e a ER para cada região das reações para haplótipo.

<i>Primers 5' → 3'</i>	Localização	Tamanho do Fragmento (pb)	ER
Haplótipo do gene da globina β			
Sítio 5'γ^G AAC-TGT-TGC-TTT-ATA-GGA-TTT-T (D) AGG-AGC-TTA-TTG-ATA-ACT-CAG-AC (R)	5'γ ^G	650	<i>Xmn</i> I
Sítio γ^G AAG-TGT-GGA-GTG-TGC-ACA-TG (D) TGC-TGC-TAA-TGC-TTC-ATT-ACA-A (R)	γ ^G	780	<i>Hind</i> III
Sítio γ^A TGC-TGC-TAA-TGC-TTC-ATT-ACA-A (D) TAA-ATG-AGG-AGC-ATG-CAC-ACA-C (R)	γ ^A	760	<i>Hind</i> III
Sítio ψβ GAA-CAG-AAG-TTG-AGA-TAG-AGA (D) ACT-CAG-TTG-TCT-TGT-GGG-CT (R)	ψβ	701	<i>Hinc</i> II
Sítio 3'ψβ TCT-GCA-TTT-GAC-TCT-GTT-AGC (D) GGA-CCC-TAA-CTG-ATA-TAA-CTA (R)	3'ψβ	590	<i>Hinc</i> II

PCR = Reação da Polimerase em Cadeia. ER = Endonuclease de restrição. pb = Pares de bases. D = Direto. R = Reverso.

Tabela 4: Condições de reação para os PCRs e RFLPs.

Região gênica	Condições dos PCRs	TA	Condições do RFLP	Volume das ER
5'γ ^G	Reagentes: 5 μL de tampão da <i>Taq</i> - 10X; 2,5 μL de MgCl ₂ - 50 mM; 5 μL de dNTPs - 2 mM; 0,5 μL de cada <i>primer</i> - 2 mM; 0,25 μL de <i>Taq</i> DNA Polimerase; Água livre de DNase e RNase - qsp 50 μL 2 μL de DNA	57°C		0,2 μL de <i>Xmn</i> I
γ ^G		60°C	Reagentes: 20 μL do produto do PCR; 3 μL de tampão da ER -10X; ER; 0,3 μL de ASB (apenas para a reação da região 5'γ ^G); Água livre de DNase e RNase - qsp 30 μL.	0,2 μL de <i>Hind</i> III
γ ^A		62°C		0,2 μL de <i>Hind</i> III
ψβ	Termociclagem: 10 minutos a 94°C; 34 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 45 segundos na TA, 1 minuto e 30 segundos a 72°C; 10 minutos a 72°C.	60°C	Incubação <i>overnight</i> a 37°C.	0,1 μL de <i>Hinc</i> II
3'ψβ		57°C		0,1 μL de <i>Hinc</i> II

PCR = Reação da Polimerase em Cadeia. RFLP = Restrição de polimorfismos por endonucleases de restrição (restriction fragment length polymorphism). TA = Temperatura de anelamento. ER = Endonuclease de restrição. MgCl₂ = Cloreto de magnésio. dNTPs = Deoxinucleotídeos trifosfatos. qsp = Quantidade suficiente para. ASB = Albumina sérica bovina.

5.9 COLETA DOS DADOS CLÍNICOS:

Os dados clínicos dos pacientes foram coletados a partir da análise dos prontuários médicos hospitalares, informações diretas obtidas do médico que os acompanha, bem como o questionário aplicado no momento da coleta (**Apêndice III**). Foram coletadas informações acerca das manifestações clínicas, tais como a ocorrência de crises de dor, pneumonia, infecções, sequestro esplênico, vaso-oclusão, esplenomegalia, insuficiência cardíaca, sequestro hepático, asma, úlcera maleolar, acidente vascular cerebral, alterações ósseas, insuficiência respiratória, retinopatia, priapismo e litíase biliar. Informações a respeito da necessidade de intervenções, tais como o uso de medicamento ou ainda a ocorrência prévia de internações e uso de hemoderivados e hidroxiuréia, também foram coletadas.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para cada SNP foi calculado pela calculadora do programa on-line da *Tufts University, USA* (www.tufts.edu). Aqueles que apresentaram associação estatisticamente significativa ($P < 0,05$), quando comparados com as frequências esperadas para cada genótipo, foram admitidos como em desequilíbrio.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas EPI INFO versão 6.04, *SPSS Statistics* versão 18.0 e o *GraphPad Prism* versão 5.0. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos para as análises realizadas.

A análise de normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. A partir desta informação, foram utilizados testes paramétricos ANOVA para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de três ou mais categorias ou o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* para as distribuições não normais, com confirmação dos resultados através do pós-teste de *Bonferroni*.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de *Mantel-Haenszel* e *Yates*. O teste exato de *Fisher* foi utilizado para as análises de valores inferiores a 4. Os ICs em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis.

Os testes de *Mann-Whitney* e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma

variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável, não normal ou normal, respectivamente.

As análises de correlação foram realizadas através dos coeficientes de correlação de *Pearson*, quando apresentavam distribuição normal, ou *Spearman*, na presença de variáveis com distribuição não normal.

6 RESULTADOS

Neste estudo foram realizadas coletas de sangue em 113 indivíduos HbSC. Para se evitar a ocorrência de desvios nos resultados, três dos 113 indivíduos inicialmente coletados foram excluídos do estudo por estarem em uso de hidroxiuréia no momento da coleta, resultando no N=110. Todos os indivíduos incluídos no estudo apresentavam perfil de Hb compatível com o genótipo HbSC. Eles apresentavam de 2 a 54 anos de idade, média de $15,72 \pm 11,72$ e mediana de 12 anos, sendo 55 (50%) do sexo feminino. A **Tabela 5** mostra as características gerais da população estudada.

Além disso, para efeito das análises estatísticas, houve a necessidade de se eliminar alguns valores, resultando na exclusão dos dados de alguns indivíduos para a avaliação de determinados parâmetros, conforme observado pelos diferentes valores de N. Desta forma, 2/110 indivíduos foram excluídos nas análises da ferritina (1463,30 e 1166,90 $\eta\text{g/mL}$), 3/110 nas análises da GGT (dois indivíduos com valores equivalentes a 309,00 U/L e um com 141,00 U/L da enzima), 1/110 para as análises envolvendo a relação albumina/globulina (RELAG - 18,50) e 2/110 para análises da PCRe (88,50 e 83,00 mg/L). Tais exclusões tiveram como objetivo eliminar a ocorrência de grandes distorções estatísticas, visto que a presença destes valores proporcionava desvios padrões superiores às respectivas médias. Outros marcadores como a haptoglobina e o ASLO necessitaram da remoção de um número elevado de valores (7 e 5, respectivamente) para que o desvio padrão ficasse inferior a média. Por isto, para estes dois marcadores foi utilizado o erro padrão, não havendo mais a necessidade de exclusão de nenhum valor.

Tabela 5: Características gerais dos indivíduos com doença SC incluídos no estudo.

Parâmetros	N	Média ± Desvio-padrão	Percentis		
			25%	50%	75%
Idade (anos)	110	15,72 ± 11,72	8	12	18
Valores Hematológicos					
Hemácias (10 ⁶ /mL)	110	4,24 ± 0,60	3,88	4,18	4,57
Hemoglobina (g/dL)	110	11,35 ± 1,25	10,48	11,35	12,10
Hematócrito (%)	110	33,72 ± 3,81	31,60	33,60	35,50
Leucócitos (/mL)	110	9441,91 ± 3240,06	6900,00	8900,00	11200,00
Segmentados (/mL)	110	4963,66 ± 2089,89	3402,00	4725,40	6050,00
Eosinófilos (/mL)	110	578,95 ± 534,21	226,00	462,00	728,00
Linfócitos típicos (/mL)	110	3163,96 ± 1485,22	2214,00	2998,50	3894,00
Monócitos (/mL)	110	618,19 ± 263,41	424,00	601,50	728,40
Plaquetas (10 ³ /mL)	110	311,15 ± 118,48	200,00	294,50	407,00
Índices Hematimétricos					
VCM (fL)	110	80,27 ± 7,72	75,90	79,75	84,40
HCM (pg)	110	27,06 ± 2,94	25,10	27,20	28,40
CHCM (%)	110	33,68 ± 1,16	33,10	33,80	34,40
Perfil de Hemoglobina					
Hemoglobina C (%)	110	43,00 ± 1,37	42,60	43,35	43,80
Hemoglobina A2 (%)	110	4,08 ± 0,51	3,80	4,00	4,30
Hemoglobina S (%)	110	50,79 ± 1,49	50,30	50,95	51,50
Hemoglobina F (%)	110	1,91 ± 1,74	0,80	1,40	2,30
Marcadores de Hemólise					
Reticulócitos (%)	109	4,23 ± 2,05	2,50	3,90	5,80
Ferro (µg/dL)	110	72,35 ± 32,44	52,00	68,50	83,00
AST (U/L)	110	35,15 ± 15,84	27,00	33,00	38,00
Bilirrubina total (mg/dL)	110	1,11 ± 0,71	0,75	0,92	1,30
Bilirrubina direta (mg/dL)	110	0,39 ± 0,28	0,30	0,30	0,40
Bilirrubina indireta (mg/dL)	110	0,72 ± 0,53	0,40	0,60	0,90
Desidrogenase Lática (U/L)	110	627,77 ± 276,91	467,00	594,50	713,00
Ferritina (ng/mL)	104	138,19 ± 113,24	58,25	107,35	178,10
Haptoglobina (mg/dL)	106	11,96 ± 2,29*	5,83	5,83	5,83
Marcadores de Perfil Lipídico					
Colesterol total (mg/dL)	110	136,54 ± 29,15	116,00	132,00	153,00
Col-HDL (mg/dL)	110	38,01 ± 8,19	31,00	37,00	43,00
Col-LDL (mg/dL)	110	82,02 ± 25,48	63,00	80,00	98,00
Col-VLDL (mg/dL)	110	16,72 ± 6,36	12,00	16,00	20,00
Triglicerídeos (mg/dL)	110	83,66 ± 31,68	58,00	80,00	99,00
Marcadores de Função Renal					
Uréia (mg/dL)	110	20,64 ± 7,06	15,00	19,50	24,00
Creatinina (mg/dL)	110	0,63 ± 0,19	0,50	0,60	0,80
Ácido Úrico (mg/dL)	110	3,97 ± 1,10	3,30	3,90	4,60
Marcadores de Função Hepática					
ALT (U/L)	110	21,01 ± 13,26	12,00	17,50	26,00
GGT (U/L)	96	23,17 ± 21,39	12,50	16,50	25,00
Fosfatase Alcalina (U/L)	99	175,99 ± 79,35	105,00	181,00	232,00
Proteínas Totais (g/dL)	110	7,91 ± 0,71	7,50	7,90	8,30
Albumina (g/dL)	110	4,49 ± 0,41	4,30	4,50	4,70
Globulinas (g/dL)	110	3,42 ± 0,73	3,00	3,40	3,90
Relação Albumina/Globulina	109	1,35 ± 0,31	1,20	1,30	1,50

Alfa 1 Antitripsina (mg/dL)	106	141,26 ± 41,02	112,00	138,00	166,00
Eletrólitos					
Potássio (mEq/L)	99	4,38 ± 0,34	4,20	4,30	4,60
Cálcio (mg/dL)	98	9,97 ± 1,08	9,30	9,90	10,60
Fósforo (mg/dL)	81	5,16 ± 0,77	4,70	5,30	5,70
Marcadores Inflamatórios					
Anti-estreptolisina O (UI/mL)	106	197,50 ± 42,96*	31,00	94,50	186,30
Proteína C Reativa (mg/L)	104	4,35 ± 3,69	1,92	2,96	5,10
Vitamina e Hormônio					
Vitamina D (ng/mL)	95	31,30 ± 9,52	24,10	29,00	36,85
Paratormônio (pg/mL)	87	52,61 ± 22,26	38,80	49,60	63,70

* Análises utilizando média ± erro padrão.

N = Tamanho amostral. VCM = Volume Corpuscular Médio. HCM = Hemoglobina Corpuscular Média. CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. AST = Aspartato Aminotransferase. Col-HDL = Lipoproteína de alta densidade (*High density lipoprotein*). Col-LDL = Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*). Col-VLDL = Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very low density lipoprotein*). ALT = Alanina Aminotransferase. GGT = Gama Glutamiltransferase.

A **Tabela 6** mostra o histórico clínico dos pacientes HbSC incluídos no estudo, bem como a frequência de intervenções realizadas visando o controle destas manifestações. Este grupo foi composto por 95 indivíduos, devido à disponibilidade dos dados relacionados.

Tabela 6: Histórico das manifestações clínicas e de intervenção entre os indivíduos HbSC.

	Não N (%)	Sim N (%)
Manifestação Clínica		
Crise de dor	8 (8,42)	87 (91,58)
Pneumonia (STA?)	53 (55,79)	42 (44,21)
Infecção	71 (74,74)	24 (25,26)
Vaso-oclusão	71 (74,74)	24 (25,26)
Sequestro Esplênico	73 (76,84)	22 (23,16)
Esplenomegalia	75 (78,95)	20 (21,05)
Insuficiência Cardíaca	76 (80,00)	19 (20,00)
Sequestro Hepático	82 (86,32)	13 (13,68)
Asma	88 (92,63)	7 (7,37)
Úlcera Maleolar	89 (93,68)	6 (6,32)
Acidente Vascular Cerebral	90 (94,74)	5 (5,26)
Alteração Óssea	90 (94,74)	5 (5,26)
Insuficiência Respiratória	91 (95,79)	4 (4,21)
Retinopatia	91 (95,79)	4 (4,21)
Priapismo	92 (96,84)	3 (3,16)
Litíase Biliar	93 (97,89)	2 (2,11)
Intervenção		
Uso de Medicamentos	2 (2,11)	93 (97,89)
Internação	21 (22,11)	74 (77,89)
Uso de Hemoderivados	78 (82,11)	17 (17,89)
Uso de Hidroxiuréia	93 (97,89)	2 (2,11)

Pode-se verificar que as manifestações clínicas mais frequentes são crises de dor e pneumonia, seguidas pelas infecções, vaso-oclusão, sequestro esplênico, esplenomegalia,

insuficiência cardíaca e sequestro hepático. Com relação à pneumonia, os dados dos prontuários médicos não apresentavam com clareza se aqueles sintomas apresentados não se tratavam de STA, ao invés de pneumonia. Houve uma proporção menor de indivíduos acometidos pela asma, úlcera maleolar, acidente vascular cerebral, alteração óssea, insuficiência respiratória, retinopatia, priapismo e litíase biliar. Quanto aos métodos de intervenção, 97,89% dos indivíduos faz uso de alguma medicação, em sua maioria o ácido fólico, analgésicos e anti-inflamatórios, sendo que a maioria necessita de internação para o controle das manifestações clínicas. O uso prévio de hemoderivados não foi intenso neste grupo, assim como o de hidroxiuréia, o qual não alcança 3% dos indivíduos.

Para 87 dos indivíduos HbSC dos quais foi realizada a determinação de SNPs no gene *K1* e a coleta de dados clínicos, observou-se que a presença do alelo mutante para o SNP rs1207568 está associada à ocorrência de infecções neste grupo de indivíduos ($P=0,0170$). Além disso, verificou-se que a presença de alelos mutantes para o SNP rs648202 foi associada ao uso de medicações para o controle das manifestações clínicas da doença ($P=0,0208$).

6.1 FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NO GENE *KI* NOS INDIVÍDUOS HbSC E COMPARAÇÕES ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS

As frequências alélicas e genóticas relativas aos quatro SNPs no gene *KI* avaliados encontram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, conforme mostra a **Tabela 7**.

O genótipo AA para o SNP rs1207568 não foi encontrado entre os indivíduos HbSC investigados. Entretanto, o genótipo AG para este SNP foi encontrado na frequência de 13,13%, sendo que seus portadores apresentaram níveis séricos médios significativamente maiores de albumina ($P=0,0370$, **Figura 3A**) quando comparados aos indivíduos homocigotos selvagens. Quanto ao SNP rs9527025, os indivíduos portadores dos genótipos mutantes GC e CC diferiram daqueles homocigotos para o alelo selvagem por apresentarem valores médios significativamente maiores de fósforo e bilirrubina direta (BD), conforme representado nas **Figuras 3B** e **3C** ($P=0,0044$ e $P=0,0092$, respectivamente). A presença do SNP rs564481 não esteve associada a qualquer diferença nos vários marcadores investigados, quando se comparou os grupos com genótipo mutante e selvagem.

Tabela 7: Distribuição das frequências alélicas e genótípicas dos SNPs no gene *Kl* nos indivíduos com HbSC, com cálculo do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

SNPs	N	Alelos	FA (%)	Genótipos	FG (%)	FRO (em %)	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	
							FE (em %)	Valor de <i>P</i>
C_7604792_10 rs1207568	99	G	185 (0,93)	Homozigoto Selvagem GG	86 (0,87)	86,87	87,30	0,482288
				Heterozigoto AG	13 (0,13)	13,13	12,30	
		A	13 (0,07)	Homozigoto Mutante AA	0 (0,00)	0	0,40	
C_2983036_20 rs9527025	99	G	164 (0,83)	Homozigoto Selvagem GG	66 (0,67)	66,67	68,60	0,172962
				Heterozigoto GC	32 (0,32)	32,32	28,40	
		C	34 (0,17)	Homozigoto Mutante CC	1 (0,01)	1,01	2,90	
C_592739_10 rs564481	99	C	166 (0,84)	Homozigoto Selvagem CC	69 (0,70)	69,70	70,30	0,662441
				Heterozigoto CT	28 (0,28)	28,28	27,10	
		T	32 (0,16)	Homozigoto Mutante TT	2 (0,02)	2,02	2,60	
C_592738_20 rs648202	99	C	121 (0,61)	Heterozigoto TC	49 (0,50)	49,50	47,50	0,678744
				Homozigoto Mutante CC	36 (0,36)	36,36	37,30	
		T	77 (0,39)	Homozigoto Selvagem TT	14 (0,14)	14,14	15,10	

SNP = Polimorfismo de nucleotídeo único (*single-nucleotide polymorphism*). HbSC = Hemoglobinopatia SC. N = Tamanho amostral. FA = Frequência alélica. FG = Frequência genotípica. FRO = Frequência relativa observada. FE = Frequência esperada.

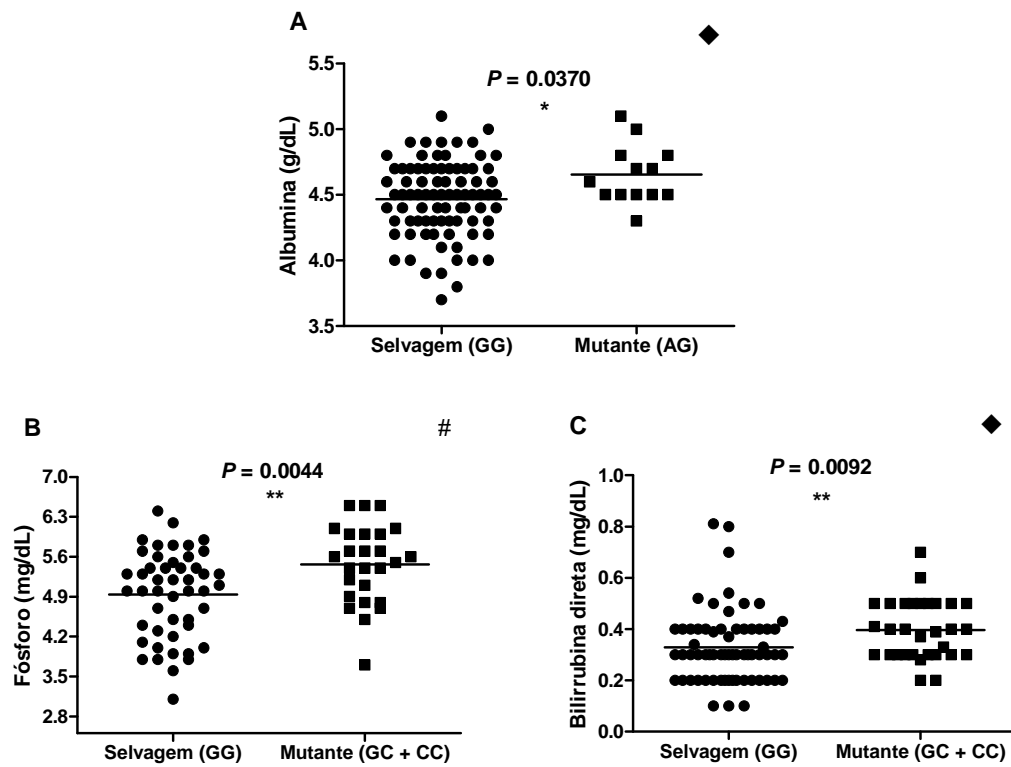


Figura 3: Comparação dos marcadores estudados entre os genótipos dos SNPs em indivíduos HbSC: comparação dos valores médios de albumina (A) entre indivíduos HbSC com genótipos selvagem e aqueles com genótipo heterozigoto para o SNP rs1207568, e dos valores médios de fósforo (B) e BD (C) entre indivíduos HbSC com genótipos selvagem e mutante para o SNP rs9527025. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*. # = *Test-t* independente. BD = Bilirrubina direta.

6.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE POTÁSSIO EM INDIVÍDUOS HbSC

De acordo com as análises estatísticas, os níveis séricos de potássio apresentaram correlação positiva significativa com a contagem global de leucócitos ($r=0,2916$, $P=0,0034$; **Figura 4 - A1**), linfócitos típicos ($r=0,2644$, $P=0,0082$; **Figura 4 - B1**) e monócitos ($r=0,2370$, $P=0,0182$; **Figura 4 - C1**). As análises destes parâmetros estavam em acordo com a análise dos valores médios de potássio nos percentis 25% e 75% de leucócitos, linfócitos típicos e monócitos ($P=0,0095$, $P=0,0053$ e $P=0,0314$, respectivamente; **Figura 4 - A2, B2 e C2**). Os valores médios de potássio não se mostraram estatisticamente diferentes quando se investigou os valores de leucócitos, linfócitos típicos e monócitos, em pacientes categorizados em grupos com valores menores que a mediana e aqueles com valores maiores ou iguais à mediana (**Figura 4 - A3, B3 e C3**).

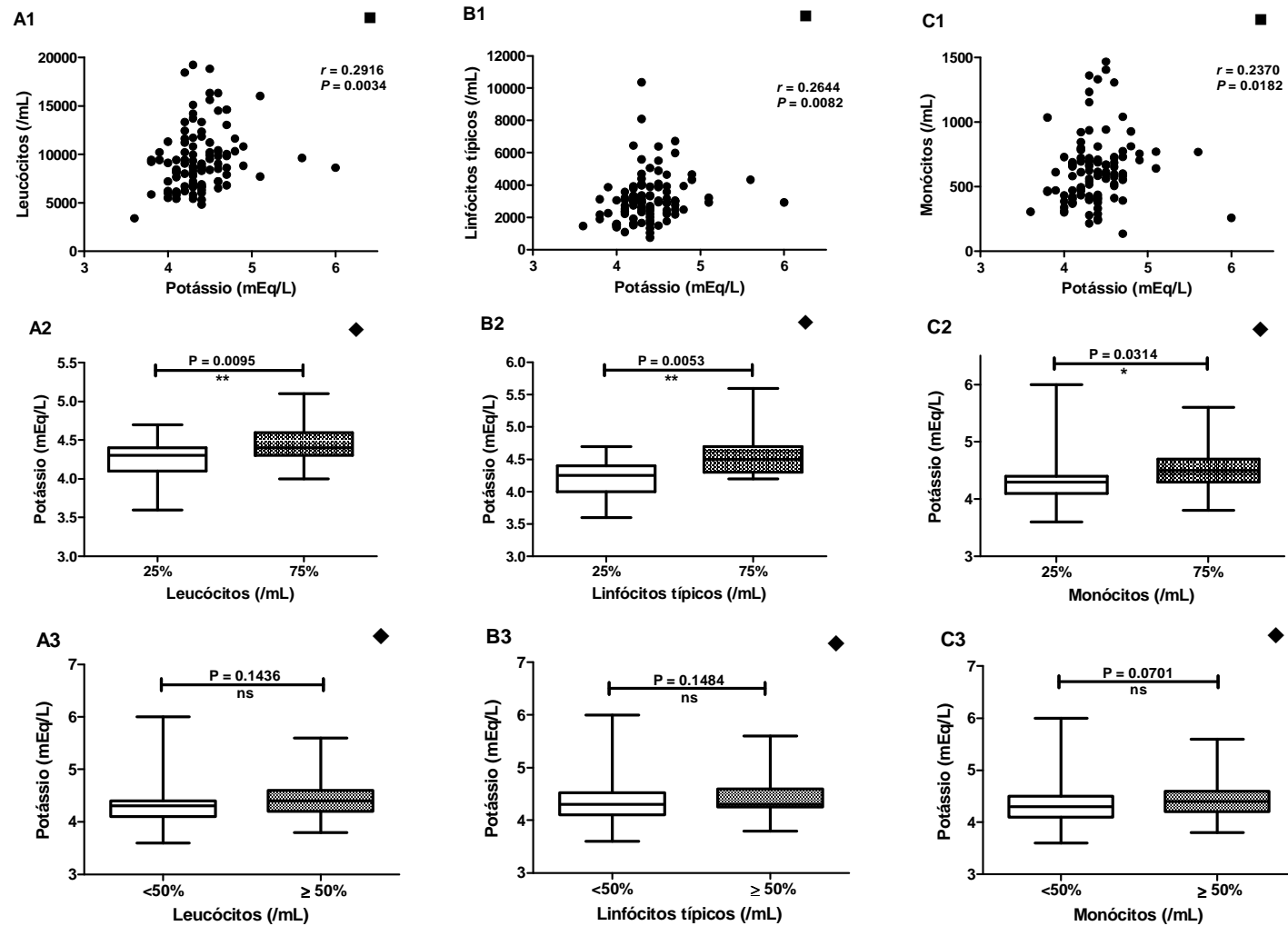


Figura 4: Correlação entre os níveis séricos de potássio e contagem de leucócitos (A1), linfócitos típicos (B1) e monócitos (C1), acompanhada pela análise dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2), além das análises com a mediana (A3, B3 e C3). ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. ◆ = Teste de *Mann-Whitney*.

As plaquetas apresentaram correlação positiva significativa com o potássio ($r=0,4889$, $P<0,0001$; **Figura 5 – A1**), dados suportados pela média maior de potássio no percentil 75% ($P=0,0003$; **Figura 5 – A2**) e no grupo que apresentava contagens de plaqueta superiores ou iguais à mediana ($P<0,0001$; **Figura 5 – A3**).

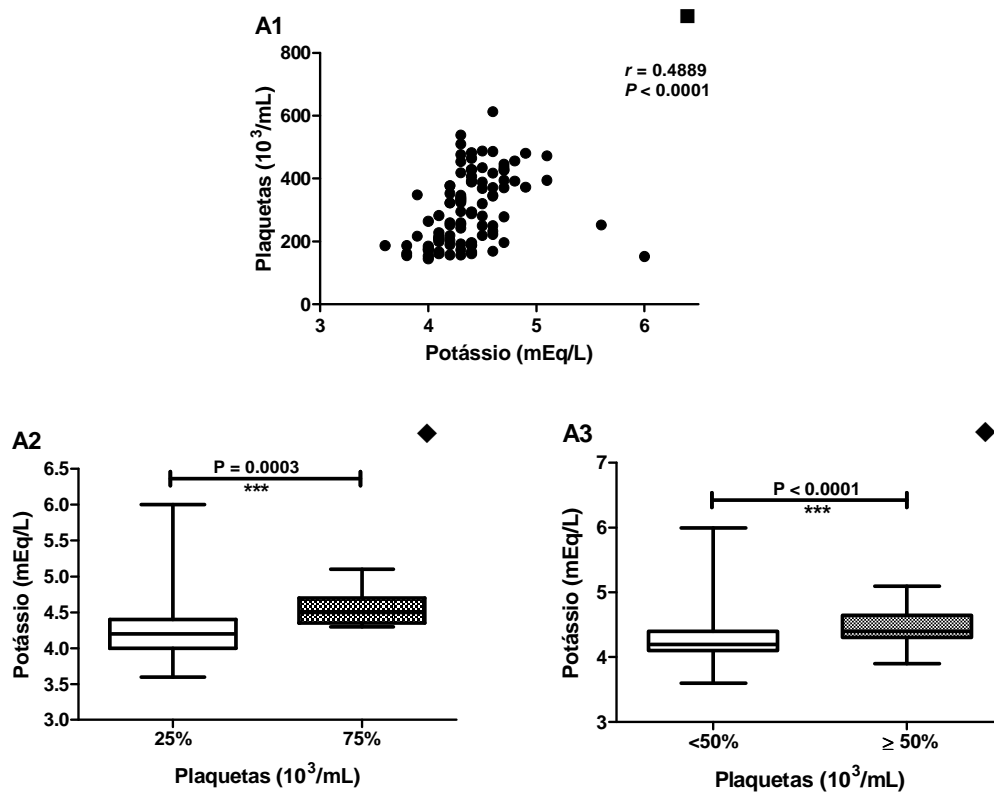


Figura 5: Correlação entre os níveis séricos de potássio e a contagem de plaquetas (**A1**), acompanhado pela análise dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (**A2**) e mediana (**A3**). ■ = Coeficiente de correlação de Spearman. ♦ = Teste de Mann-Whitney.

O potássio também teve correlação positiva com relação ao colesterol total ($r=0,2521$, $P=0,0118$; **Figura 6 – A1**) e sua fração Col-LDL ($r=0,2953$, $P=0,0030$; **Figura 6 – B1**). Os valores médios do percentil 75% destes marcadores foram significativamente maiores quando comparados ao percentil 25% ($P=0,0194$ e $P=0,0081$, respectivamente; **Figura 6 – A2 e B2**). Os valores médios de potássio também foram significativamente superiores no grupo de indivíduos HbSC com níveis de marcadores associados ao perfil lipídico maiores ou iguais à mediana ($P=0,0055$ e $P=0,0072$, respectivamente; **Figura 6 – A3 e B3**).

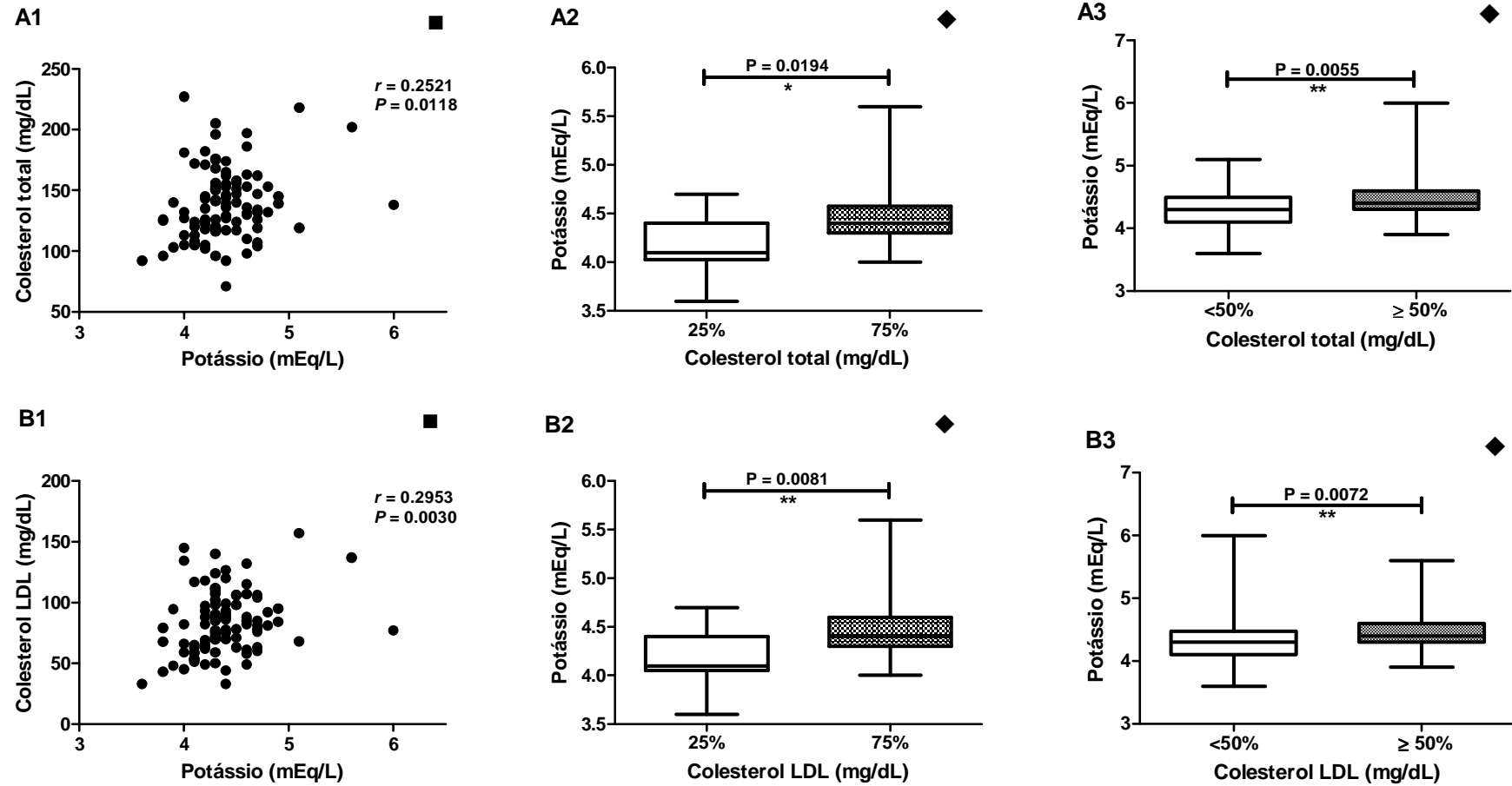


Figura 6: Correlação entre os níveis séricos de potássio e colesterol total (A1) e Col-LDL (B1), e análise dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3). ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. ◆ = Teste de *Mann-Whitney*. Col-LDL = Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*).

A correlação entre o potássio e o fósforo mostrou significância estatisticamente positiva ($r=0,2447$, $P=0,0277$; **Figura 7 – A1**). O percentil 75% apresentou valores médios de potássio significativamente maiores do que o percentil 25% ($P=0,0093$; **Figura 7 – A2**). A análise da mediana não foi estatisticamente significativa (**Figura 7 – A3**).

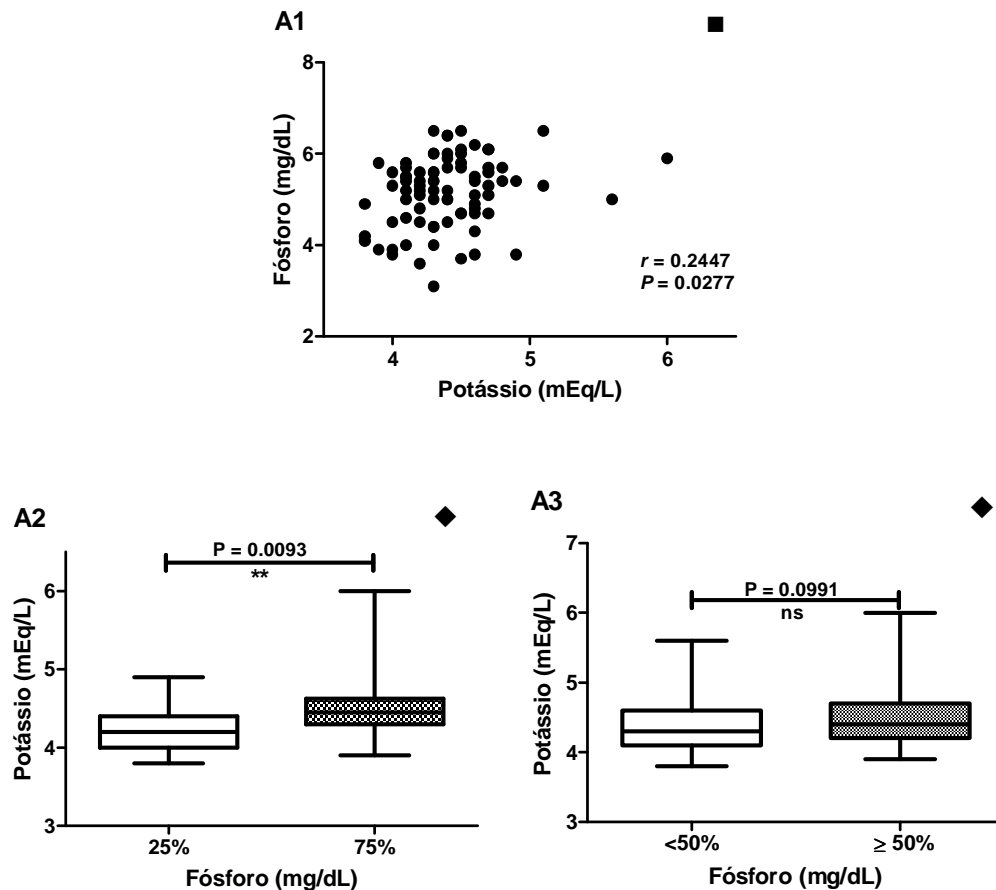


Figura 7: Correlação entre os níveis séricos de potássio e fósforo (**A1**), acompanhado pelos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (**A2**) e mediana (**A3**). ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*.

As PTs ($r=0,2415$, $P=0,0160$), a ferritina ($r=0,2263$, $P=0,0283$) e a PCRe ($r=0,2369$, $P=0,0222$) apresentaram correlação positiva significativa com o potássio (**Figura 8 – A1, B1 e C1**, respectivamente). Entretanto, a análise dos percentis não apresentou significância estatística (**Figura 8 – A2, B2 e C2**). Na análise da mediana, apenas a ferritina apresentou diferença significativa entre o grupo com valores menores e aquele com valores maiores ou iguais à mediana ($P=0,0279$; **Figura 8 – A3, B3 e C3**).

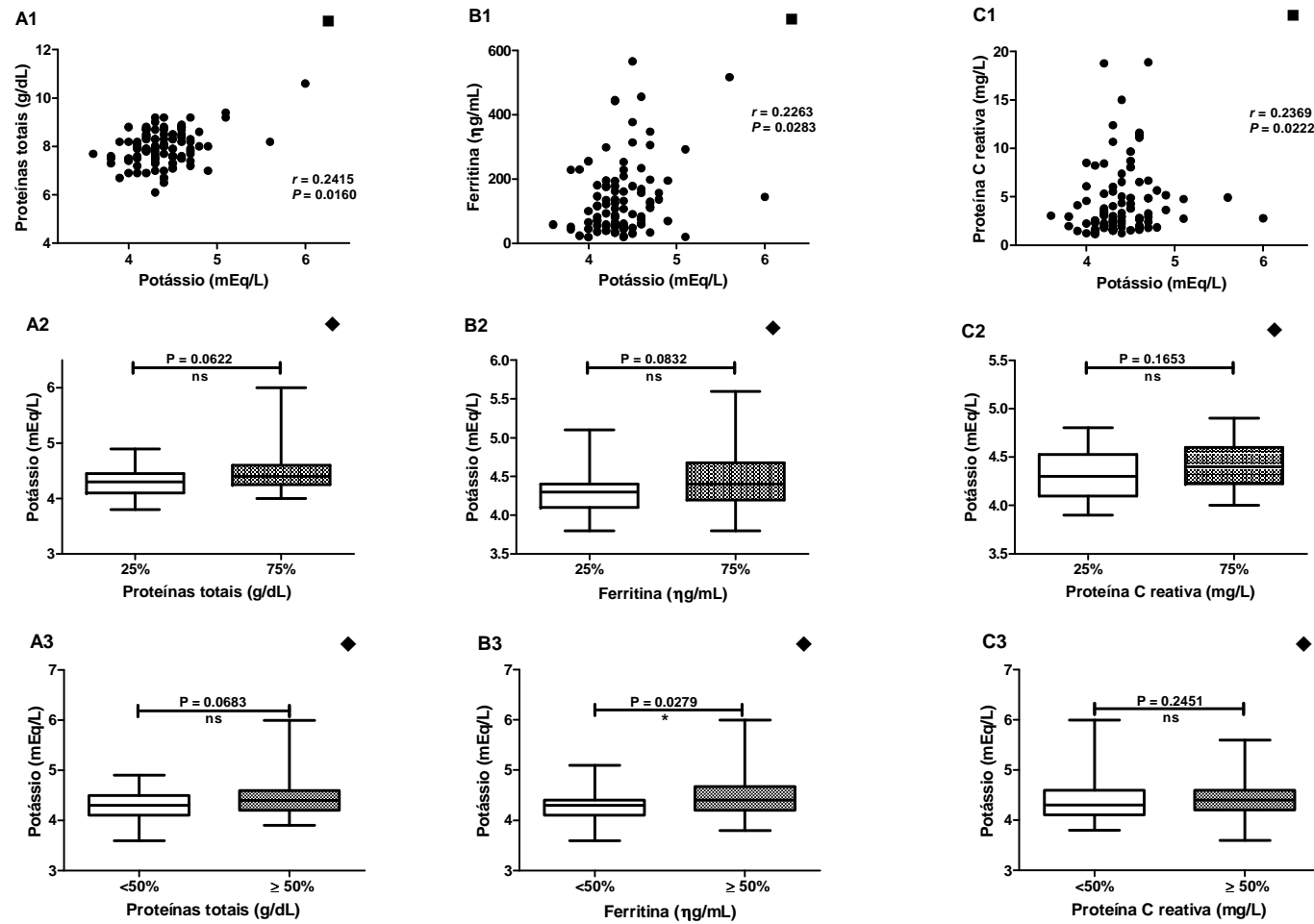


Figura 8: Correlação entre os níveis séricos de potássio e PTs (A1), ferritina (B1) e PCr (C1), acompanhado pelos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). ■ = Coeficiente de correlação de Spearman. ◆ = Teste de Mann-Whitney. PTs = Proteínas totais. PCr = Proteína C reativa.

A análise de correlação mostrou correlação significativa negativa do potássio com as hemácias ($r=-0,2076$, $P=0,0392$; **Figura 9 – A1**) e a HbF ($r=-0,2328$, $P=0,0204$; **Figura 9 – B1**) e positiva com a HbS ($r=0,2474$, $P=0,0135$; **Figura 9 – C1**). Desta forma, o valor médio de potássio do percentil 75% foi significativamente menor quando comparado com o percentil 25% para as hemácias ($P=0,0351$; **Figura 9 – A2**) e HbF ($P=0,0180$; **Figura 9 – B2**) e maior quando comparado ao percentil 25% para a HbS ($P=0,0129$; **Figura 9 – C2**). Pela análise das medianas, o valor médio de potássio foi significativamente menor no grupo cujos níveis de hemácias ($P=0,0190$) e HbF ($P=0,0483$) eram maiores ou iguais à mediana e no grupo no qual os níveis de HbS ($P=0,0435$) eram menores que a mediana (**Figura 9 – A3, B3 e C3**, respectivamente).

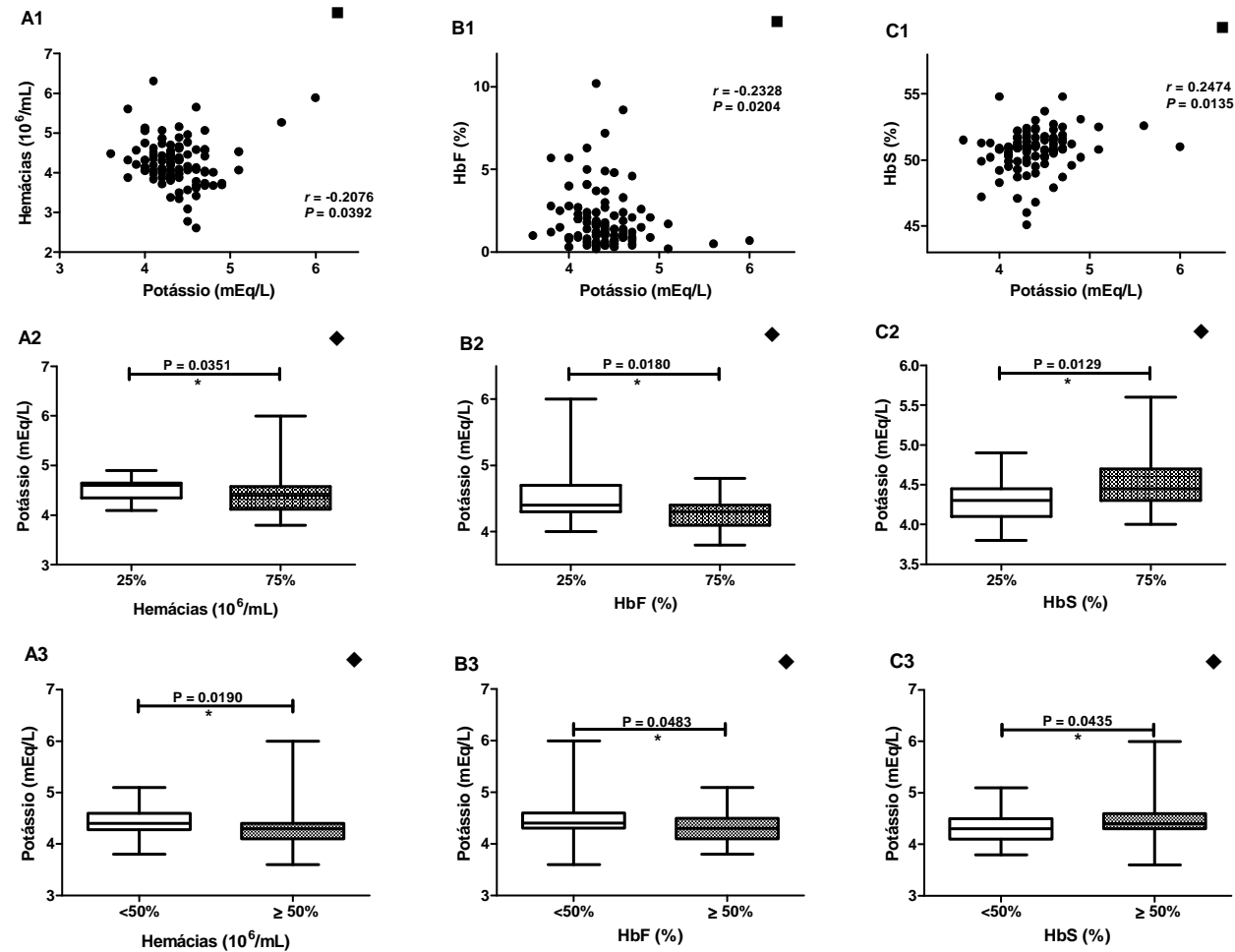


Figura 9: Análise de correlação entre os níveis séricos de potássio e hemácias (A1), HbF (B1) e HbS (C1), com suas respectivas análises dos valores médios de potássio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*. HbF = Hemoglobina fetal. HbS = Hemoglobina variante S.

6.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CÁLCIO NOS INDIVÍDUOS HbSC

Os níveis séricos de cálcio apresentaram correlação positiva significativa com PTs ($r=0,2991$, $P=0,0028$; **Figura 10 – A1**) e albumina ($r=0,3242$, $P=0,0011$; **Figura 10 – B1**). Acompanhando estes resultados, os níveis médios de cálcio foram maiores no percentil 75% para as PTs ($P=0,0005$) e albumina ($P=0,0016$), quando se comparou os percentis 25% e 75% (**Figura 10 – A2 e B2**, respectivamente). Os níveis de cálcio foram significativamente menores quando associados aos grupos cujos níveis de PTs e albumina eram inferiores à mediana ($P=0,0049$ e $P=0,0158$, respectivamente; **Figura 10 – A3 e B3**).

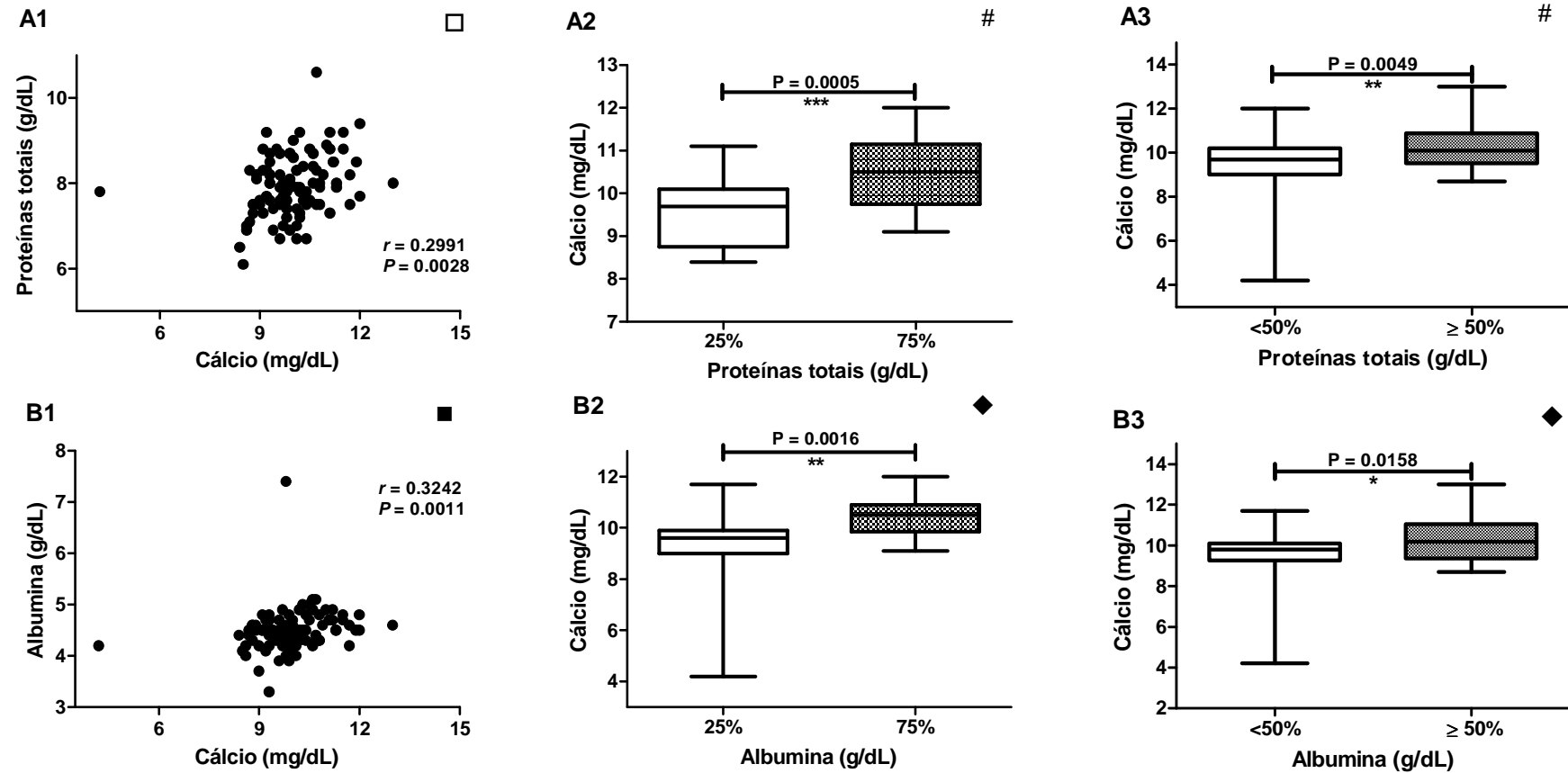


Figura 10: Correlação entre os níveis séricos de cálcio e PTs (A1) e albumina (B1), acompanhada pelos valores médios de cálcio para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*. PT = Proteínas totais.

A análise de correlação mostrou uma correlação negativa significativa entre cálcio e ASLO ($r=-0,2216$, $P=0,0309$; **Figura 11 – A1**), cujo padrão foi mantido na análise dos percentis, onde os níveis médios de cálcio foram significativamente menores no percentil 75% ($P=0,0127$; **Figura 11 – A2**), bem como na análise das medianas, cujos níveis médios de cálcio foram significativamente menores no grupo onde os níveis de ASLO foram maiores ou iguais a mediana ($P=0,0209$; **Figura 11 – A3**).

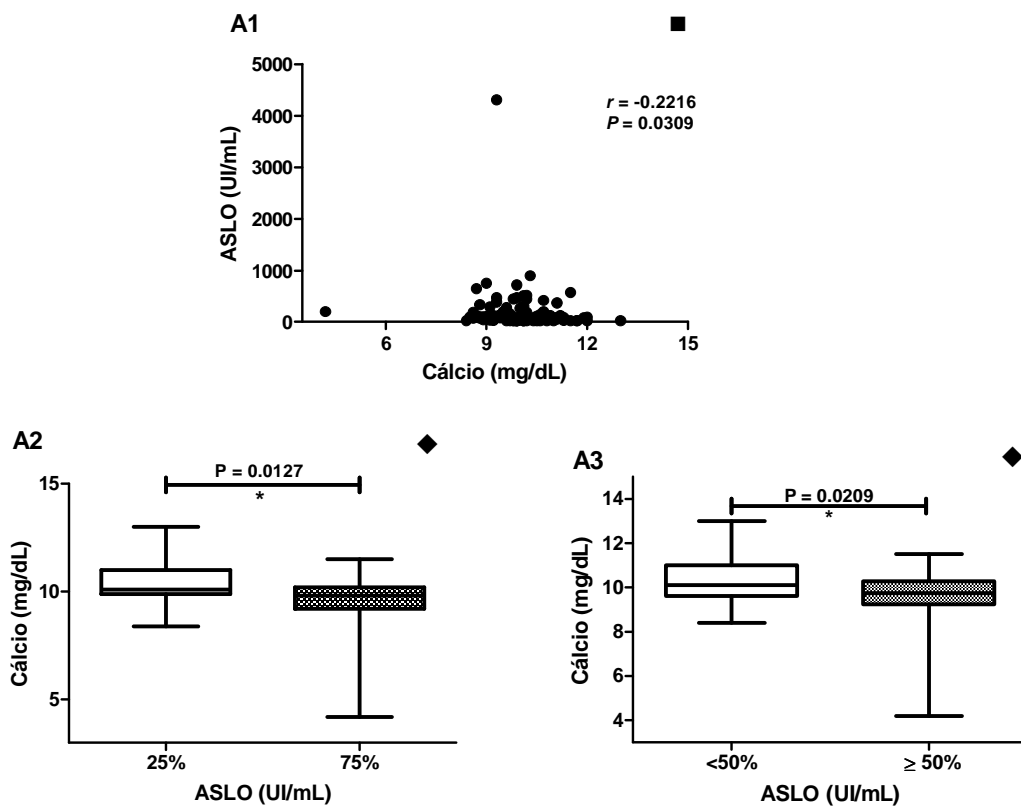


Figura 11: Correlação entre os níveis séricos de cálcio e ASLO (A1), acompanhado pela análise dos valores médios de cálcio para os percentis 25% e 75% (A2) e mediana (A3). ■ = Coeficiente de correlação de Spearman. ◆ = Teste de Mann-Whitney. ASLO = Anti-estreptolisina O.

6.4 PERFIL DOS NÍVEIS SÉRICOS DE FÓSFORO EM INDIVÍDUOS HbSC

Os níveis séricos de fósforo apresentaram correlação negativa significativa com as concentrações de Hb ($r=-0,3083$, $P=0,0051$; **Figura 12 – A1**) e com o Ht ($r=-0,2610$, $P=0,0186$; **Figura 12 – B1**). De forma correspondente, o percentil 75% destes dois parâmetros apresentaram valores médios de fósforo significativamente inferiores aos do percentil 25% ($P=0,0017$ e $P=0,0013$, respectivamente; **Figura 12 – A2 e B2**). Na análise da mediana, os níveis médios de fósforo foram significativamente menores apenas para a Hb no grupo cujos níveis eram maiores ou iguais ao da mediana ($P=0,0116$; **Figura 12 – A3 e B3**).

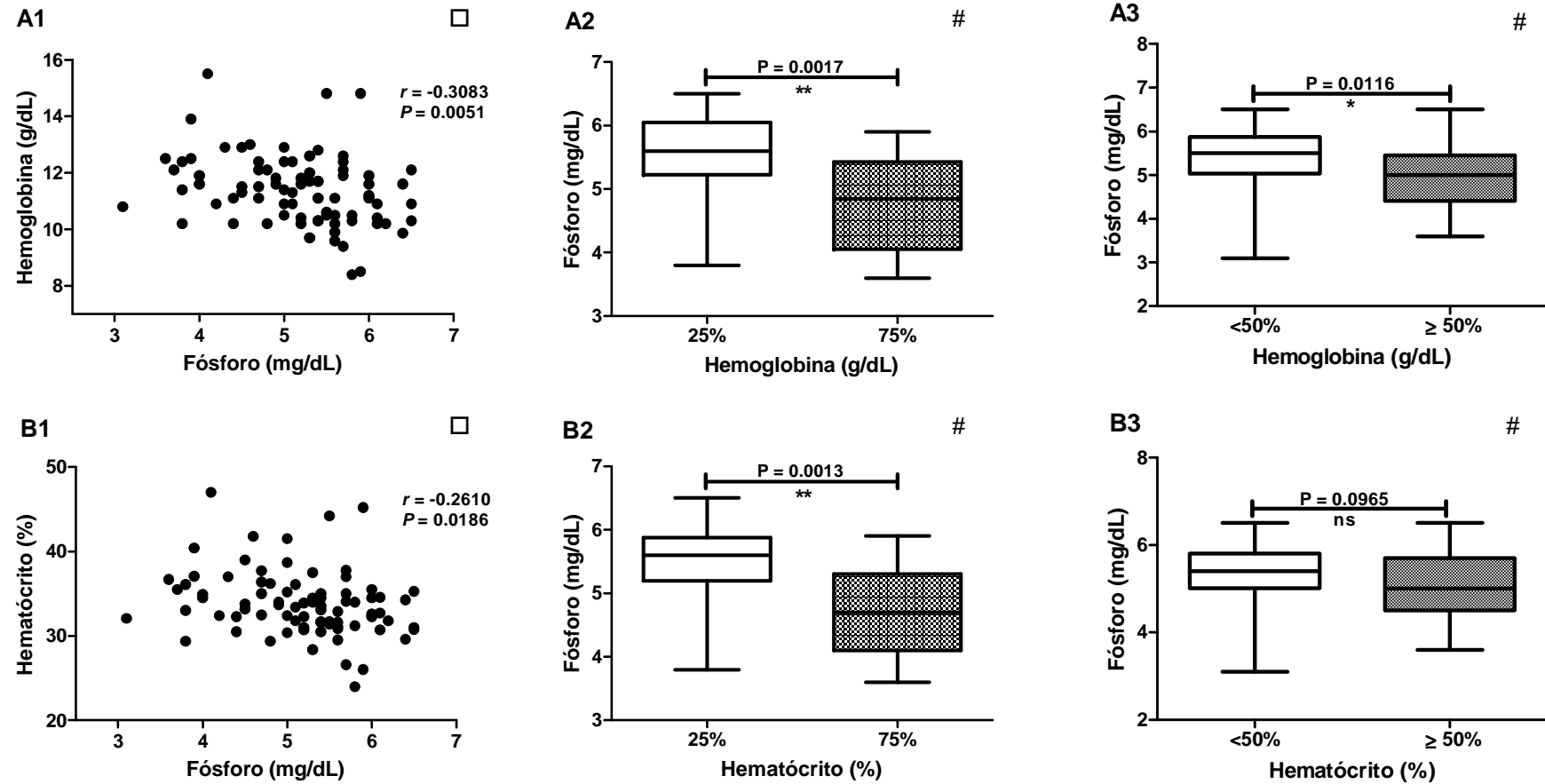


Figura 12: Correlação entre os níveis séricos de fósforo e concentração de Hb (A1) e Ht (B1), acompanhada pelos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. # = *Test-t* independente. Hb = Hemoglobina. Ht = Hematócrito.

Foi encontrada correlação positiva significativa entre fósforo e eosinófilos ($r=0,4383$, $P<0,0001$; **Figura 13 – A1**), linfócitos típicos ($r=0,2560$, $P=0,0211$; **Figura 13 – B1**) e plaquetas ($r=0,3598$, $P=0,0010$; **Figura 13 – C1**). Destes, apenas os eosinófilos ($P=0,0009$) e as plaquetas ($P=0,0002$) apresentaram o percentil 75% significativamente superior ao percentil 25% (**Figura 13 – A2, B2 e C2**, respectivamente). Da mesma forma, a análise das medianas mostrou níveis significativamente maiores nos grupos com valores maiores ou iguais ao da mediana apenas para os eosinófilos ($P=0,0002$) e plaquetas ($P=0,0490$) (**Figura 13 – A3, B3 e C3**).

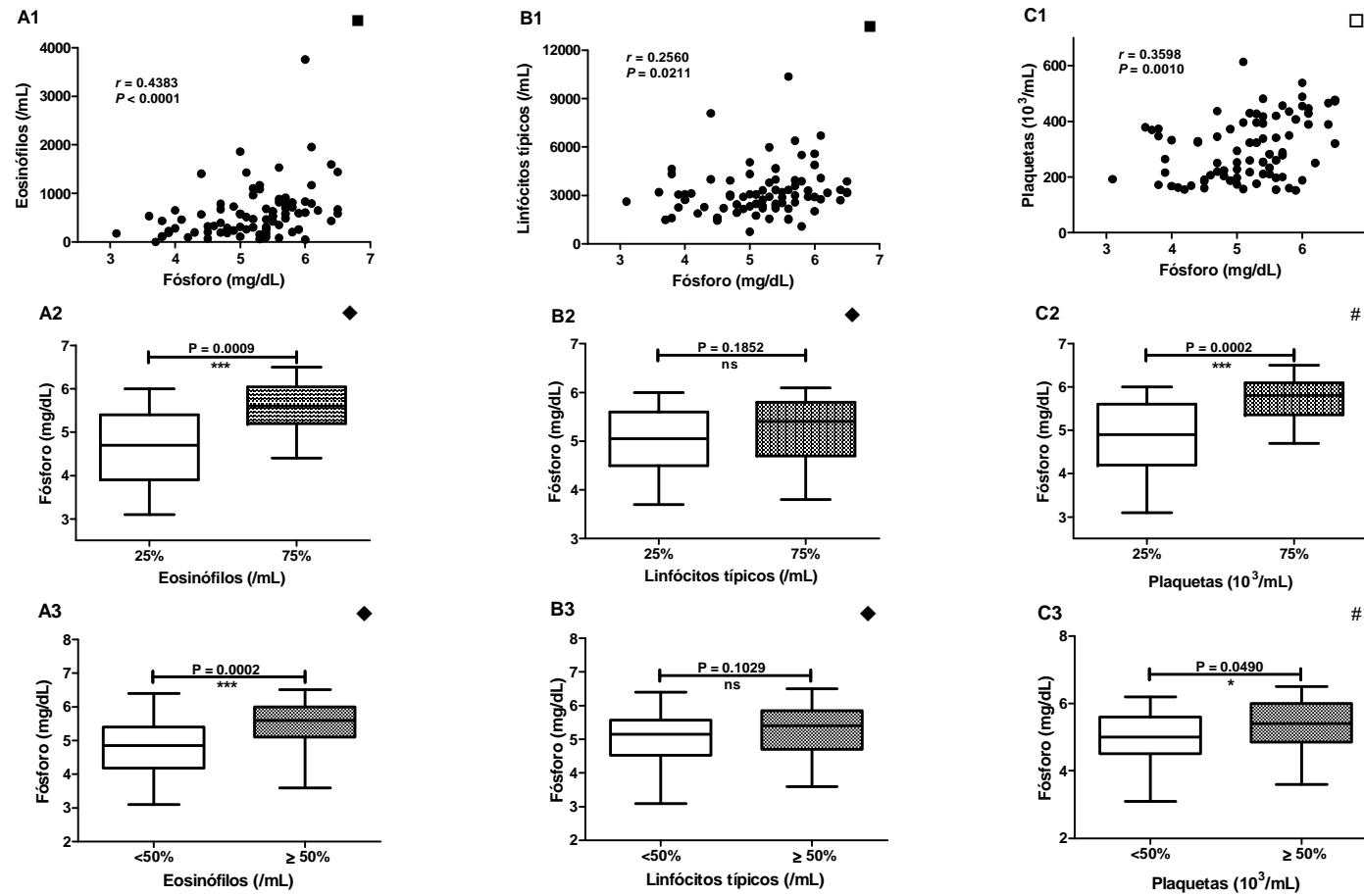


Figura 13: Correlação entre os níveis séricos de fósforo e a contagem de eosinófilos (A1), linfócitos típicos (B1) e plaquetas (C1), acompanhada pelos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ◆ = Teste de *Mann-Whitney*.

Com relação aos marcadores de hemólise, o AST teve correlação positiva significativa com o fósforo ($r=0,3088$, $P=0,0050$; **Figura 14 – A1**), com valor médio de fósforo maior para o percentil 75% ($P=0,0010$; **Figura 14 – A2**). A bilirrubina indireta (BI) teve correlação negativa significativa com o fósforo ($r=-0,2685$, $P=0,0154$; **Figura 14 – B1**), apesar de não ter apresentado diferença significativa entre os percentis 25% e 75% (**Figura 14 – B2**). Na análise das medianas, apenas a BI apresentou significância estatística, com os níveis de fósforo menores no grupo onde os níveis desta bilirrubina foram maiores ou iguais à mediana ($P=0,0018$; **Figura 14 – A3 e B3**).

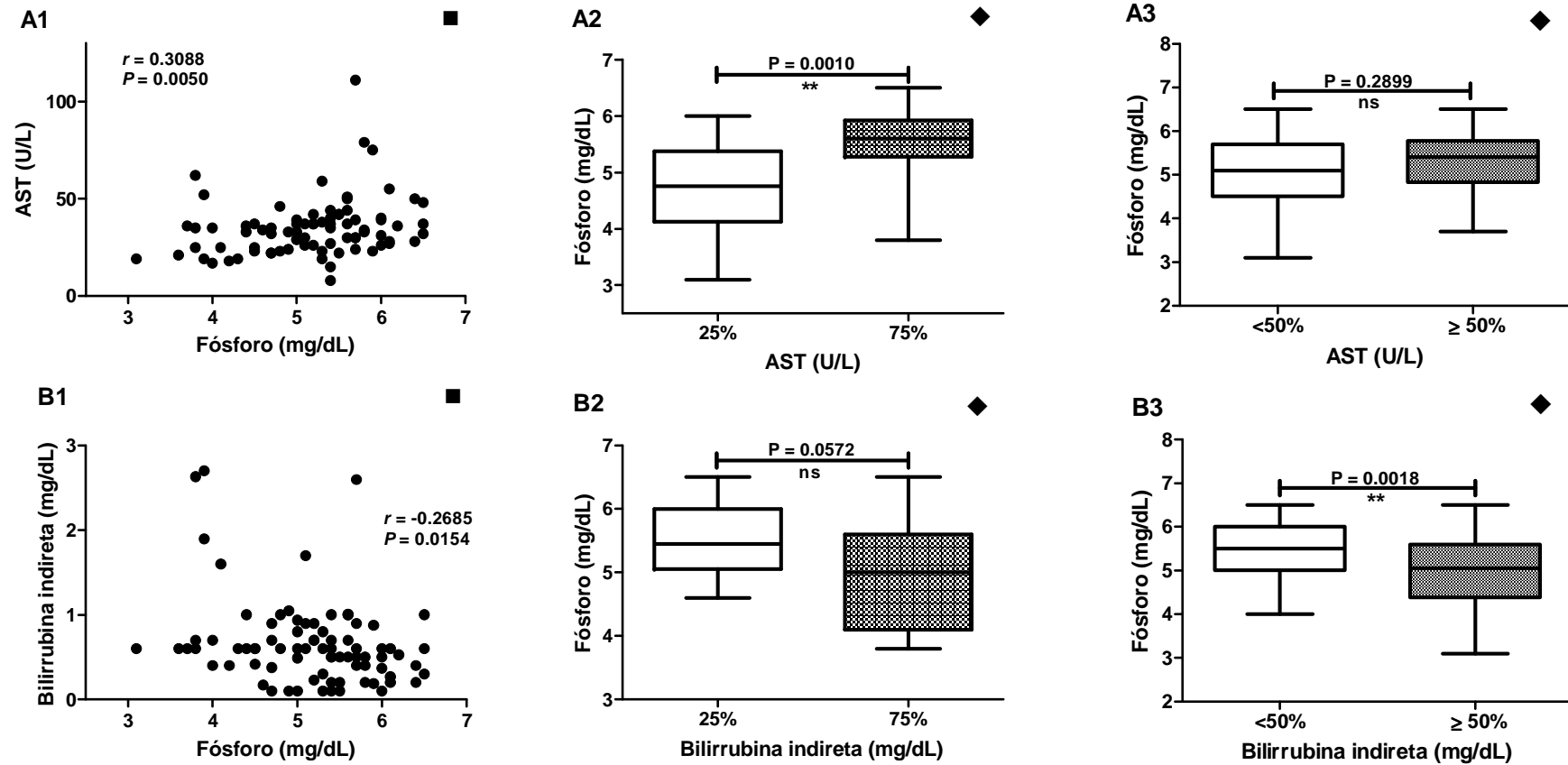


Figura 14: Correlação entre os níveis séricos de fósforo e AST (A1) e BI (B1), acompanhada pela análise dos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3). ■ = Coeficiente de correlação de Spearman. ◆ = Teste de Mann-Whitney. AST = Aspartato aminotransferase. BI = Bilirrubina indireta.

A análise dos marcadores renais e hepáticos mostrou a existência de correlação negativa significativa entre os níveis de fósforo e os de creatinina ($r=-0,3844$, $P=0,0004$; **Figura 15 – A1**), com percentil 75% significativamente menor quando comparado ao percentil 25% ($P=0,0140$; **Figura 15 – A2**), bem como correlação positiva significativa com os níveis de ALT ($r=0,2203$, $P=0,0481$; **Figura 15 – B1**) e FAL ($r=0,5185$, $P<0,0001$; **Figura 15 – C1**), ambos com percentil 75% superior ao percentil 25%, embora esta diferença tenha sido significativa apenas para a FAL ($P<0,0001$; **Figura 15 – B2 e C2**). Na análise das medianas, os níveis de fósforo foram significativamente menores para a creatinina e maiores para a FAL nos grupos onde os valores eram maiores ou iguais à mediana (**Figura 15 – A3, B3 e C3**).

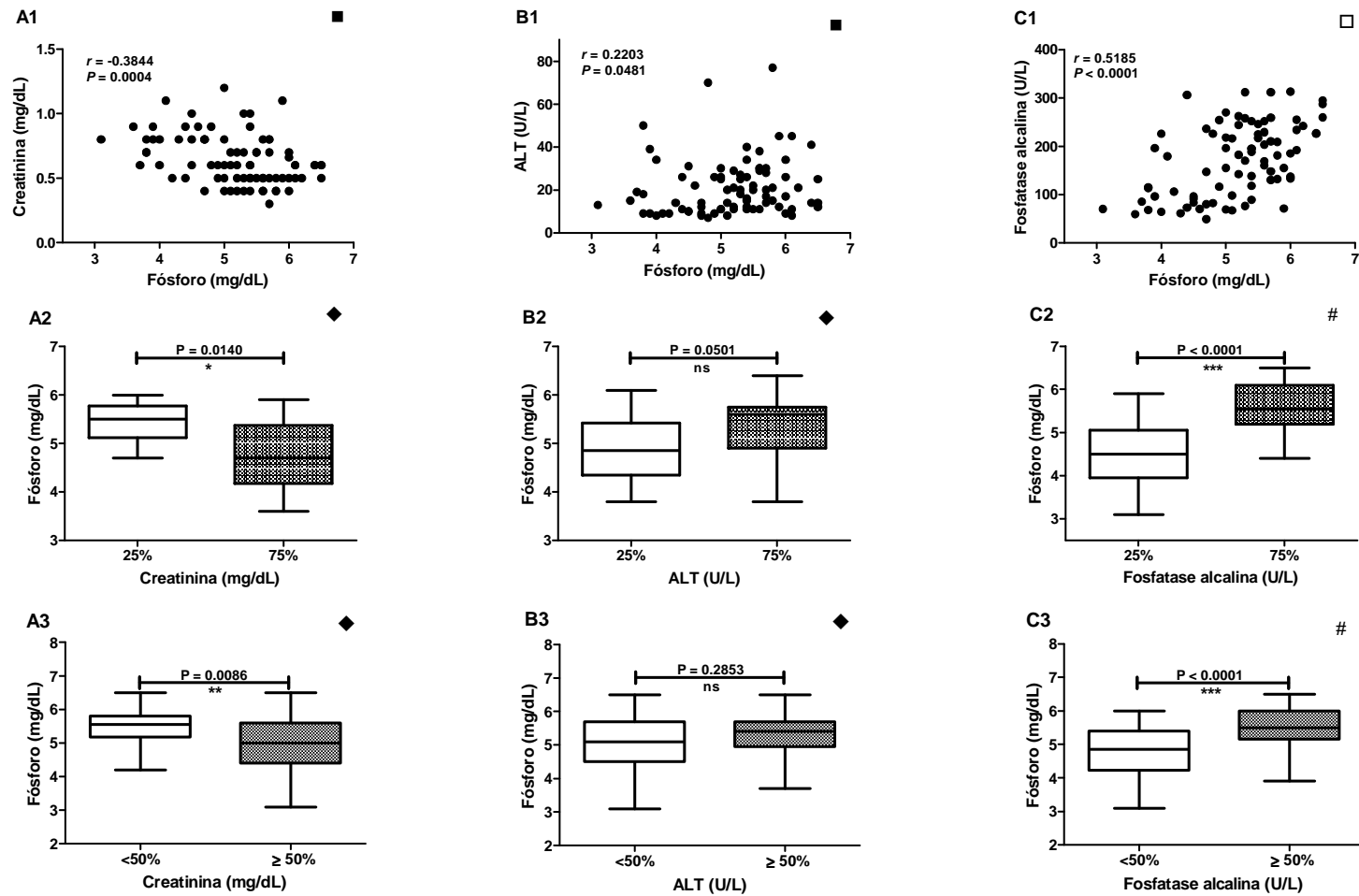


Figura 15: Correlação entre os níveis séricos de fósforo e creatinina (A1), ALT (B1) e FAL (C1), acompanhada pelos valores médios de fósforo para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*. ALT = Alanina aminotransferase. FAL = Fosfatase alcalina.

6.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM INDIVÍDUOS HbSC

Na população estudada neste trabalho, dos 95 indivíduos dos quais foi possível a realização da dosagem de VitD, observou-se que 49 (51,58%) apresentavam valores insuficientes de VitD (10 a 30 ng/mL), mas não deficientes (< 10 ng/mL), segundo valores de referência sugeridos pelo Kit utilizado. Os demais indivíduos apresentavam-se com níveis suficientes da vitamina (30 a 100 ng/mL), enquanto 0% da população tinha níveis enquadrados como deficiência de VitD.

Os valores de VitD apresentaram correlação negativa significativa com o ferro sérico ($r=-0,3459$, $P=0,0006$; **Figura 16 – A1**) e o VCM ($r=-0,2071$, $P=0,0441$; **Figura 16 – B1**). A diferença entre os percentis 25% e 75% foi significativa apenas para o ferro sérico e confirmou o padrão da correlação encontrada ($P=0,0065$; **Figura 16 – A2 e B2**). Na análise das medianas, valores médios significativamente maiores de VitD foram observados nos grupos onde os níveis de ferro sérico e VCM foram menores que a mediana ($P=0,0071$ e $P=0,0286$, respectivamente; **Figura 16 – A3 e B3**).

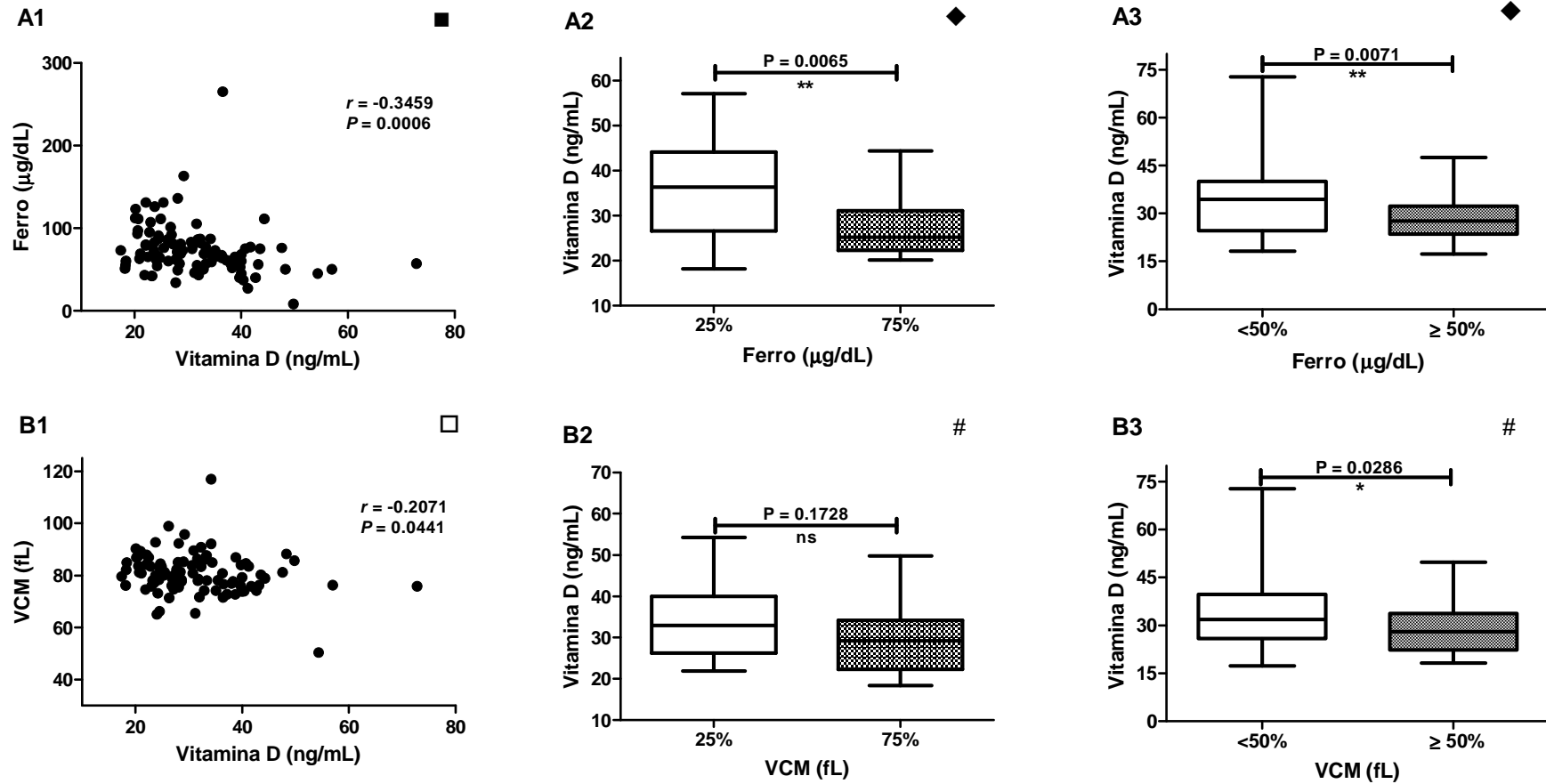


Figura 16: Correlação entre os níveis séricos de VitD e ferro sérico (A1) e VCM (B1), acompanhada pelos valores médios de VitD para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ◆ = Teste de *Mann-Whitney*. VitD = Vitamina D. VCM = Volume corpuscular médio.

A VitD apresentou correlação negativa significativa com os níveis de BD ($r=-0,2629$, $P=0,0101$; **Figura 17 – A1**) e positiva com a contagem de reticulócitos ($r=0,2361$, $P=0,0220$; **Figura 17 – B1**). Os níveis médios de VitD, em concordância com as análises de correlação, foram significativamente menores para o percentil 75% da BD ($P=0,0051$; **Figura 17 – A2**) e para o grupo cujos valores desta bilirrubina eram maiores ou iguais ao da mediana ($P=0,0035$; **Figura 17 – A3**). Da mesma forma, os níveis de VitD foram significativamente superiores no percentil 75% dos reticulócitos ($P=0,0453$; **Figura 17 – B2**) e no grupo no qual as contagens de reticulócitos foram maiores ou iguais à mediana ($P=0,0394$; **Figura 17 – B3**).

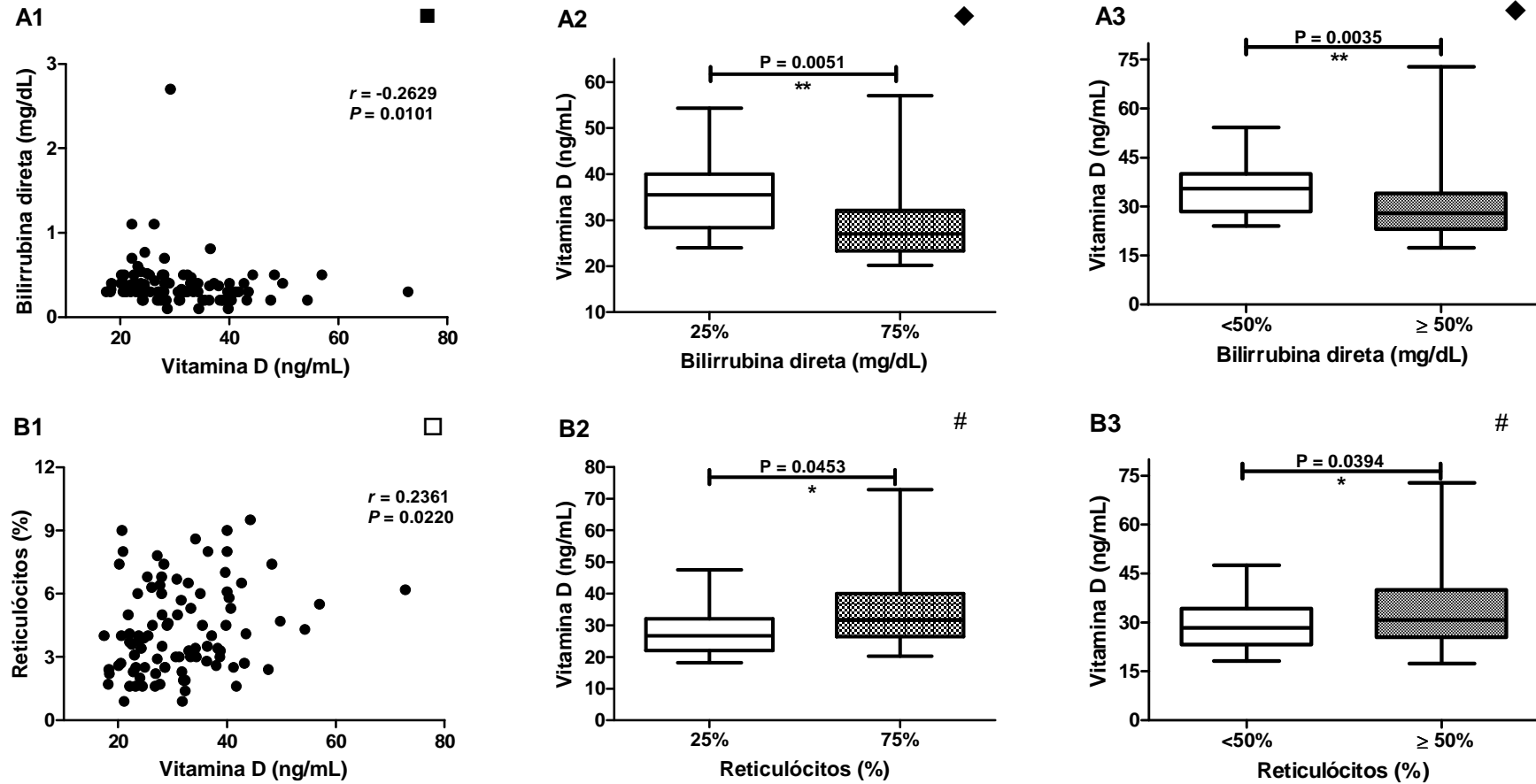


Figura 17: Correlação entre os níveis séricos de VitD e BD (A1) e contagem de reticulócitos (B1), acompanhada pelos valores médios de VitD para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ◆ = Teste de *Mann-Whitney*. VitD = Vitamina D. BD = Bilirrubina direta.

Outras correlações significativas positivas foram encontradas entre a VitD e os linfócitos típicos ($r=0,2306$, $P=0,0245$; **Figura 18 – A1**) e a PCRe ($r=0,2113$, $P=0,0420$; **Figura 18 – B1**), além de uma correlação negativa com o PTH ($r=-0,3689$, $P=0,0004$; **Figura 18 – C1**). Entretanto, apenas para a PCRe e para o PTH a diferença entre os percentis 25% e 75% foi significativa ($P=0,0310$ e $P=0,0013$, respectivamente; **Figura 18 – A2, B2 e C2**). Contudo, na análise das medianas ocorreu significância estatística para a diferença nos três marcadores (linfócitos típicos, PCRe e PTH): os níveis médios de VitD foram maiores para os linfócitos típicos e a PCRe, bem como menores para o PTH nos grupos com valores maiores ou iguais à mediana ($P=0,0148$, $P=0,0155$ e $P=0,0010$, respectivamente; **Figura 18 – A3, B3 e C3**).

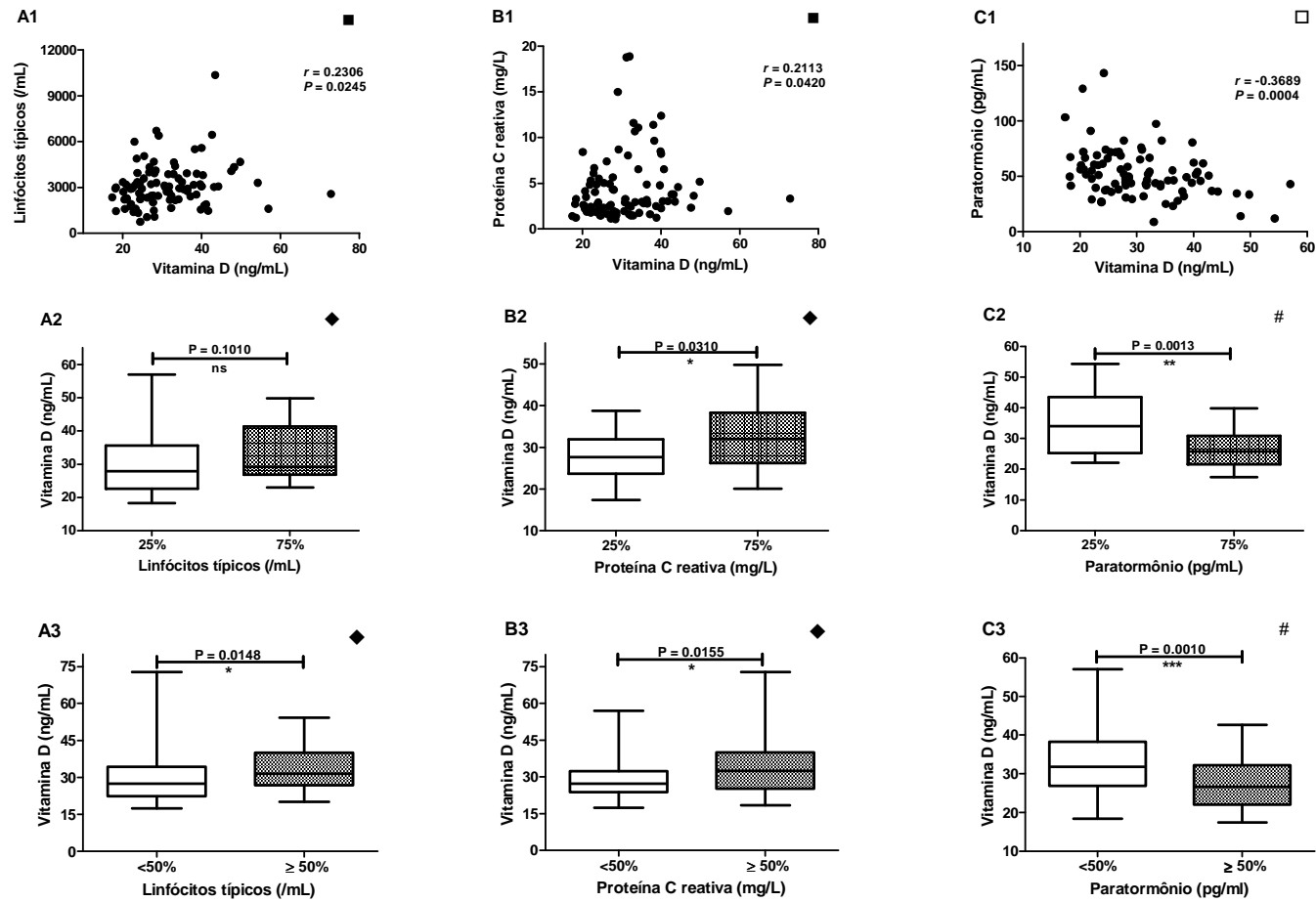


Figura 18: Correlação entre os níveis séricos de VitD e linfócitos típicos (A1), PCRe (B1) e PTH (C1), acompanhada pelos valores médios de VitD para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*. VitD = Vitamina D. PCRe = Proteína C reativa. PTH = Paratormônio.

6.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PARATORMÔNIO EM INDIVÍDUOS HbSC

Os níveis de PTH apresentaram correlação negativa significativa com o total de leucócitos ($r=-0,2618$, $P=0,0143$; **Figura 19 – A1**), com os linfócitos típicos ($r=-0,2966$, $P=0,0053$; **Figura 19 – B1**) e com os monócitos ($r=-0,2723$, $P=0,0107$; **Figura 19 – C1**). Em concordância com as correlações, a diferença entre os percentis 25% e 75% foi significativa para os três marcadores ($P=0,0054$, $P=0,0087$ e $P=0,0098$, respectivamente; **Figura 19 – A2, B2 e C2**). A análise das medianas mostrou valores de PTH significativamente menores no grupo de indivíduos HbSC com valores maiores ou iguais à mediana para os linfócitos típicos e os monócitos ($P=0,0374$ e $P=0,0435$, respectivamente; **Figura 19 – A3, B3 e C3**).

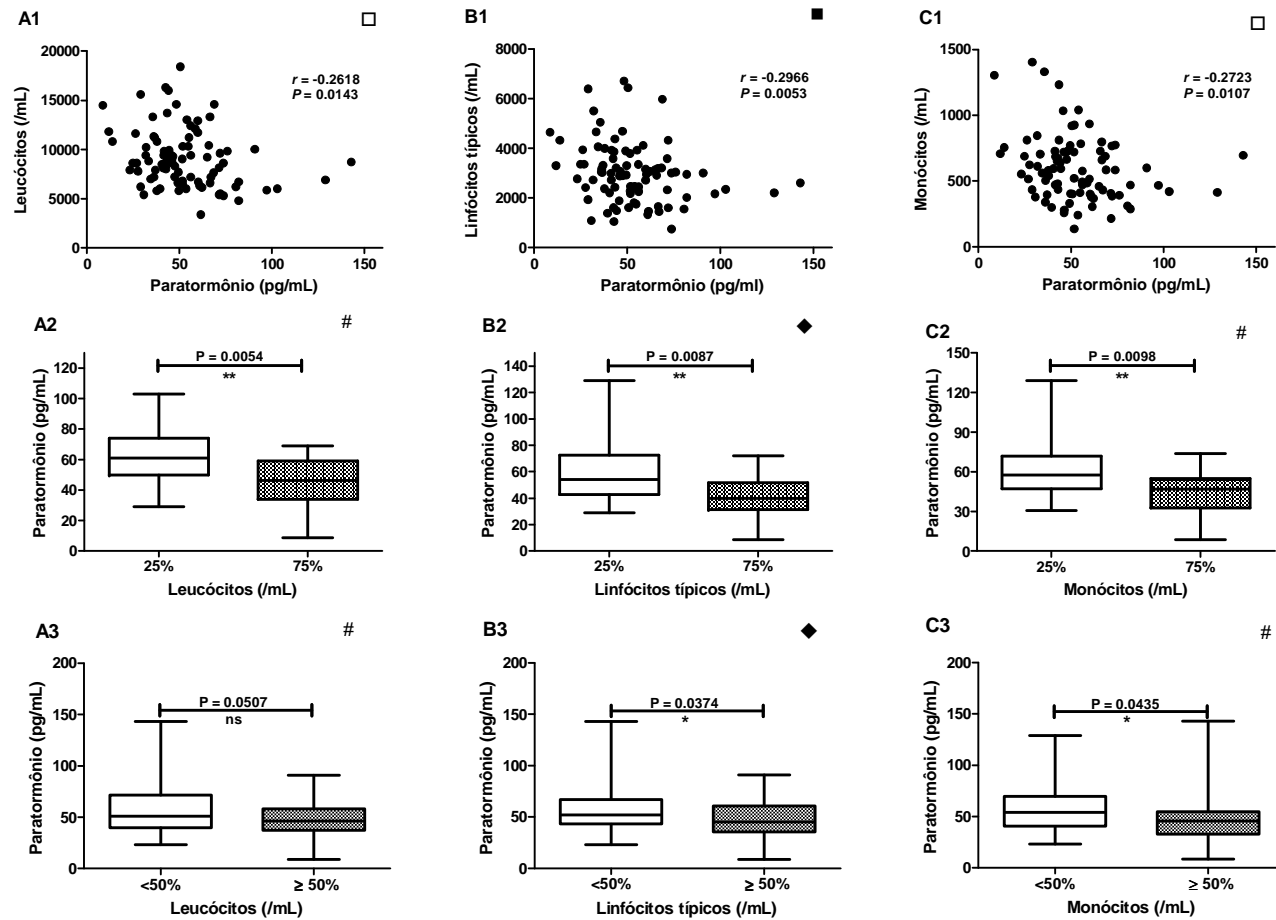


Figura 19: Correlação entre os níveis séricos de PTH e contagem de leucócitos (A1), linfócitos típicos (B1) e monócitos (C1), acompanhada pela análise dos valores médios de PTH para os percentis 25% e 75% (A2, B2 e C2) e mediana (A3, B3 e C3). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. # = *Test-t* independente. ♦ = Teste de *Mann-Whitney*. PTH = Paratormônio.

Quanto aos marcadores de perfil lipídico, o PTH também apresentou correlação negativa significativa com os níveis de colesterol total ($r=-0,2282$, $P=0,0335$; **Figura 20 – A1**) e com o Col-LDL ($r=-0,2470$, $P=0,0211$; **Figura 20 – B1**). O Col-LDL mostrou diferença significativa entre os percentis 25% e 75% ($P=0,0215$; **Figura 20 – A2 e B2**). Entretanto, esta diferença não foi observada na análise das medianas para nenhum outro marcador de perfil lipídico (**Figura 20 – A3 e B3**).

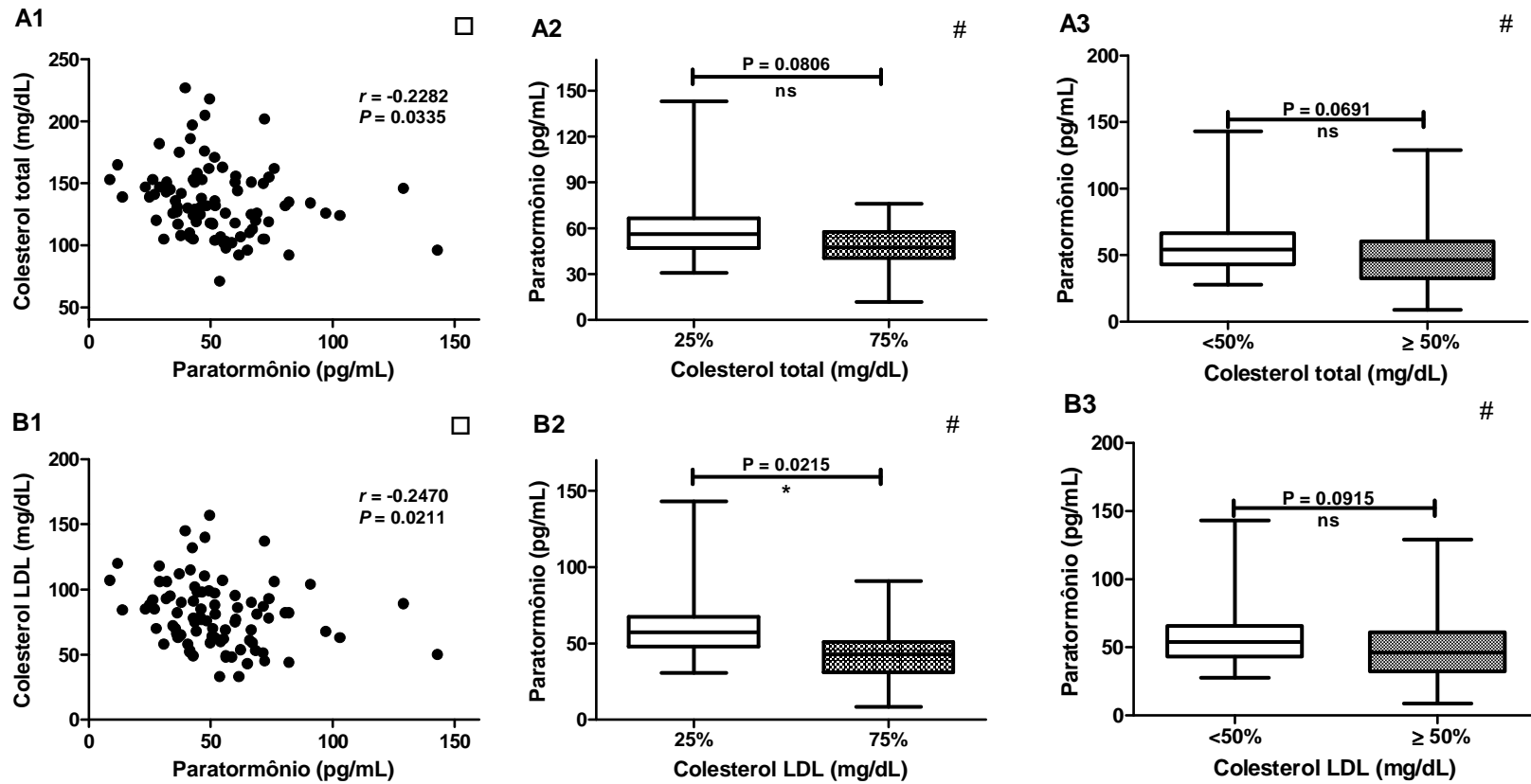


Figura 20: Análises de correlação entre os níveis séricos de PTH e colesterol total (**A1**) e sua fração Col-LDL (**B1**), bem como a análise dos valores médios de PTH para os percentis 25% e 75% (**A2 e B2**) e mediana (**A3 e B3**). □ = Coeficiente de correlação de *Pearson*. # = *Test-t* independente. PTH = Paratormônio. Col-LDL = Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*).

Os níveis de PTH apresentaram correlação negativa estatisticamente significativa com a BD ($r=-0,2462$, $P=0,0443$) e o AST ($r=-0,2274$, $P=0,0342$); contudo, não houve significância estatística para as diferenças entre os percentis 25% e 75% e nas análises das medianas (**Figura 21**).

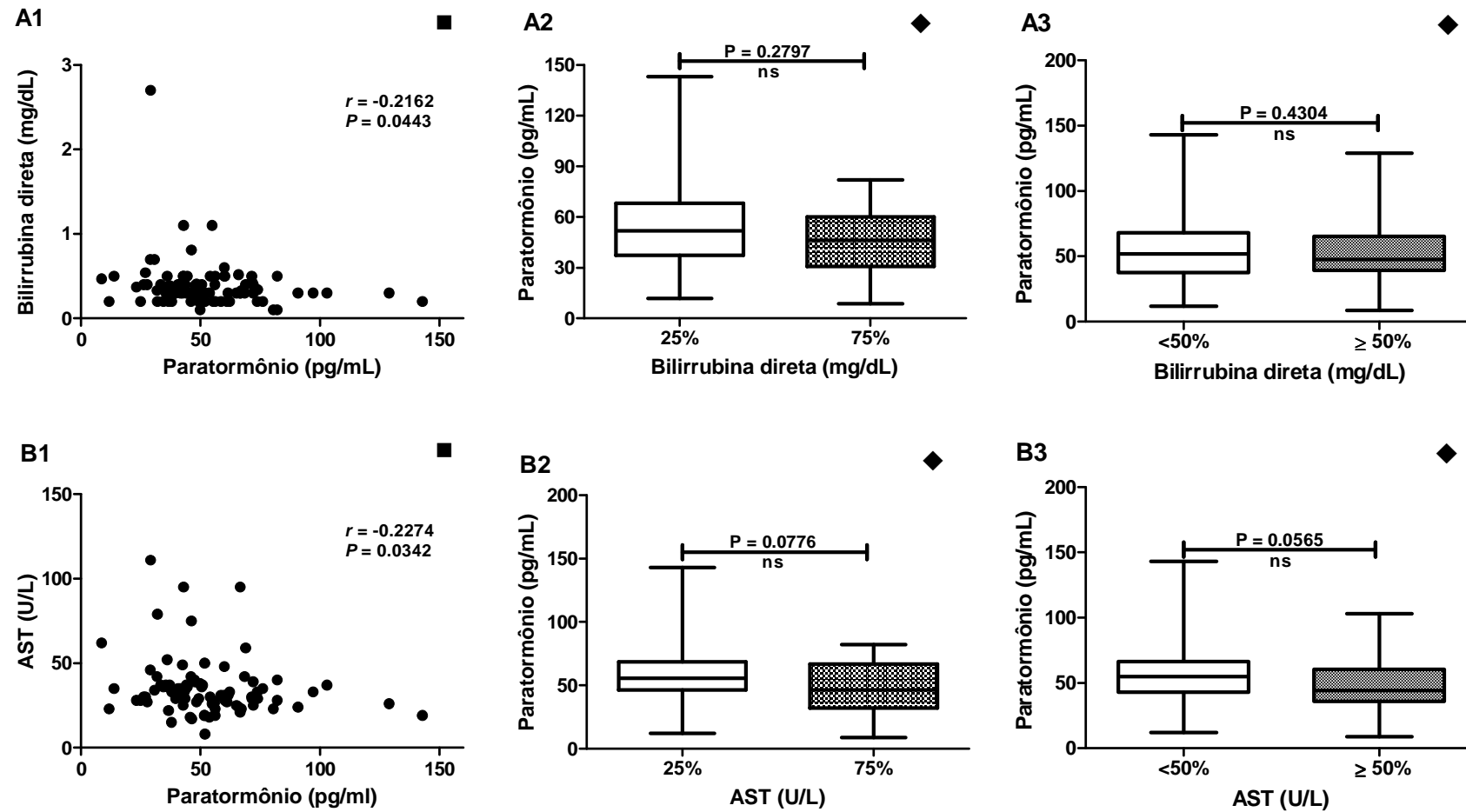


Figura 21: Correlação entre os níveis séricos de PTH e os níveis de BD (A1) e AST (B1), acompanhada pelos valores médios de PTH para os percentis 25% e 75% (A2 e B2) e mediana (A3 e B3). ■ = Coeficiente de correlação de *Spearman*. ◆ = Teste de *Mann-Whitney*. PTH = Paratormônio. BD = Bilirrubina direta. AST = Aspartato aminotransferase.

6.7 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS DOS GENES DA GLOBINA B EM INDIVÍDUOS HbSC

Dos 110 indivíduos incluídos no estudo, 103 tiveram a identificação dos haplótipos dos genes da globina β , sendo verificado a presença de 51 (49,51%) indivíduos com o haplótipo BEN (BEN/I e BEN/II), 42 (40,78%) com o CAR (CAR/I e CAR/II), 6 (5,83%) com o Atp e 4 (3,88%) com o CAR/III.

Foram avaliados 88 indivíduos quanto a existência de associações entre os haplótipos (BEN/I, BEN/II, CAR/I e CAR/II) e os SNPs no gene *Kl*, não sendo encontradas associações estatisticamente significantes. Da mesma forma, não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os diferentes haplótipos e os níveis de potássio, cálcio, fósforo, VitD ou PTH.

Os indivíduos com haplótipo BEN tiveram valores médios maiores de creatinina ($P=0,012$) e de globulina ($P=0,006$), quando comparados aos indivíduos com haplótipo CAR.

Apenas quatro indivíduos tiveram o haplótipo CAR/III e por isto não participaram das análises acima descritas. Estes indivíduos apresentavam contagens médias reduzidas de hemácias e concentrações médias reduzidas para Hb, Ht, VCM, HCM e haptoglobina, bem como contagens médias elevadas para reticulócitos e concentrações elevadas de DHL. Dois dos quatro indivíduos CAR/III apresentaram contagens elevadas de leucócitos. Os valores médios de Col-HDL estavam reduzidos. Um destes indivíduos apresentou níveis aumentados de AST, ALT e GGT, concomitantemente. Apenas um deles encontrava-se em estado de insuficiência de VitD.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a existência de associação entre SNPs no gene *Kl* e a ocorrência de infecções (rs1207568) e com o uso de medicações para o controle das manifestações clínicas (rs648202) em indivíduos com HbSC. Foi evidenciada também a associação do SNP rs1207568 com os níveis séricos de albumina e do SNP rs9527025 com os níveis séricos de fósforo e BD. O potássio, cálcio, fósforo, VitD e PTH, descritos como marcadores cujos níveis sofrem regulação direta ou indireta pela proteína Klotho, também foram investigados em relação aos marcadores de gravidade na DF. Os resultados obtidos revelaram a ocorrência de correlação entre os níveis séricos de potássio e a contagem de leucócitos, linfócitos típicos e monócitos, bem como plaquetas e com as concentrações de colesterol total e Col-LDL, fósforo, PTs, ferritina, PCRe, contagem de hemácias e concentrações de HbF e HbS. Quanto ao cálcio, foi observada sua correlação com os níveis séricos de PTs, albumina e ASLO. O fósforo teve correlação significativa com os níveis de Hb, o Ht, eosinófilos, linfócitos típicos e plaquetas, AST, BI, creatinina, ALT e FAL. O VCM, os níveis séricos de ferro, BD, reticulócitos, linfócitos típicos, PCRe e PTH foram correlacionados aos níveis séricos de VitD nestes indivíduos. Por fim, o PTH foi correlacionado com os leucócitos, linfócitos típicos, monócitos, colesterol total e Col-LDL, BD e AST.

A literatura relata a ação da proteína Klotho como co-receptora para a atuação do FGF23, e este, por sua vez, está envolvido na inibição da expressão de *CYP27B1* e na indução da expressão de *CYP24A1*, promovendo desta forma a inibição da síntese de VitD (NAKATANI *et al.*, 2009). Em contrapartida, a VitD tem envolvimento não apenas na homeostasia mineral e óssea, mas também na modulação do sistema imune, a partir da sua síntese em monócitos/macrófagos e sua atuação de forma intrácrina na modulação da resposta imune inata a agentes agressores. O sinal gerado a partir da interação entre padrões de membrana associados a patógenos (PAMPs) e os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors* - TLRs) estimula a expressão da 1α -hidroxilase e aumenta a expressão do receptor de VitD, o VDR. A interação entre a VitD sintetizada e o VDR promove um estímulo suficiente para a expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos, tal como a catelicidina. A ação da interleucina-1 β (IL-1 β) sobre seus receptores em monócitos se interliga com a ação da VitD produzida intracrinamente, promovendo a expressão da defensina beta (β)4, a qual,

juntamente com a catalecidina, conduz à morte do microorganismo nos fagolisossomos (LIU *et al.*, 2006; ADAMS *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009). Tal evento também ocorre em barreiras epiteliais, como a do pulmão, de maneira independente da ativação de TLRs, devido à expressão constitutiva da 1 α -hidroxilase (HANSDOTTIR *et al.*, 2008). Além disso, a VitD produzida em monócitos/macrófagos pode atuar localmente no controle do perfil de citocinas em linfócitos T e B ativados que expressam VDR, contribuindo para a manutenção de um microambiente inflamatório (ADAMS, 2010). Neste estudo foi observado que os indivíduos mantiveram certa preservação dos níveis de VitD, não sendo detectado nenhum indivíduo com deficiência da vitamina. O que se sugere a respeito da associação encontrada entre o SNP rs1207568 e a presença de infecções neste estudo, portanto, é que nos indivíduos portadores deste SNP o defeito na síntese da proteína Klotho pode comprometer seus níveis, levando provavelmente a prejuízos no controle negativo do FGF23 sobre a síntese de VitD, sobretudo em monócitos, conforme descrito por NAKATANI e colaboradores (2009). Em adição, vale ressaltar que a ingestão de azeite de dendê, condimento característico de pratos típicos da nossa culinária, pode ter contribuído para a preservação dos níveis de VitD. O fruto do qual é extraído o óleo de dendê nativo contém ergosterol, e a exposição solar do fruto promove a conversão do ergosterol em VitD, embora a quantidade produzida da vitamina seja inferior àquela obtida do óleo de fígado de bacalhau (DANN, 1932). Porém, o emprego do óleo de dendê no preparo dos alimentos pode estar contribuindo para a manutenção dos níveis de VitD observados em nossa amostra, independente das outras alterações encontradas. Com isto, a manutenção dos níveis da vitamina pode estar sustentando uma resposta imune inata contra as infecções nestes indivíduos.

O SNP rs648202 foi associado ao uso de medicações para o controle das manifestações clínicas da doença, em especial os analgésicos e antiinflamatórios. A literatura não tem descrito esta associação, mas é compreensível que a demanda aumentada pelo uso de medicações subentende uma ocorrência maior de manifestações clínicas nestes indivíduos com DF e, portanto, uma gravidade maior da doença. Contudo, novas investigações precisam ocorrer para confirmar a associação deste SNP com a gravidade clínica nestes indivíduos.

Não houve neste estudo associação significativa entre SNPs no gene *Kl* e osteonecrose, priapismo ou úlceras de perna, em desacordo com trabalhos prévios (BALDWIN *et al.*, 2005; NOLAN *et al.*, 2005; NOLAN *et al.*, 2006). ULUG e colaboradores (2009) também não obtiveram sucesso na replicação destas associações devido à utilização de

um tamanho amostral inadequado, bem como pela não realização de exames de imagem em controles, a exemplo da ressonância magnética, não sendo possível assegurar que tais indivíduos não se tratavam de pacientes assintomáticos em estágios iniciais de necrose avascular. ELLIOTTE e colaboradores (2007) também testaram a associação de SNPs no *KI* em pacientes com DF e priapismo, mas sem reprodução da associação entre os SNPs e o subfenótipo. Este resultado divergente, quando comparado àquele obtido por NOLAN e colaboradores (2005), foi justificado entre outros motivos pelos diferentes ajustes realizados nos testes destes dois estudos. No caso do presente estudo, a ausência de associações entre os SNPs estudados e a ocorrência de osteonecrose, priapismo e úlcera de perna possivelmente pode ter sido em decorrência dos SNPs avaliados, que foram diferentes daqueles estudados nos outros trabalhos, cuja presença pode não interferir de forma substancial nos mecanismos pertinentes a tais eventos clínicos. Além disso, o nosso estudo foi desenvolvido em pacientes HbSC, enquanto os demais estudos contemplaram os indivíduos com AF. Na HbSC ocorrem manifestações clínicas mais voltadas aos danos a órgãos, enquanto os eventos de hemólise têm implicações maiores para os agravos na AF. Sendo assim, os SNPs avaliados podem ter repercussões diferentes entre estes dois grupos amostrais. Para tal, seria interessante a condução de ensaios dosando os níveis da proteína Klotho e a avaliação dos mecanismos envolvidos com esta proteína nestes dois tipos de população. O caráter retrospectivo do levantamento dos dados clínicos também pode ter acolhido possíveis falhas de notificação destes dados nos prontuários pesquisados. Em contrapartida, o envelhecimento da população estudada pode acarretar na incidência de casos novos destes subfenótipos, conduzindo a uma significância estatística, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre crianças e adultos quando foram realizadas as avaliações por idade. Outro ponto a ser considerado é que, tratando-se de indivíduos com HbSC, cujos eventos clínicos são menos intensos do que nos indivíduos com AF, a taxa de descontinuidade do acompanhamento é considerável, principalmente em adultos. Durante o período das coletas de amostras de sangue, alguns indivíduos relataram que estavam retornando para o acompanhamento após muitos anos sem irem à Fundação HEMOBA. Neste período de afastamento podem ter ocorrido manifestações clínicas tratadas em outros centros de saúde, sendo que estas manifestações não foram registradas nos prontuários médicos analisados para a coleta de dados clínicos. Pode ter ocorrido o esquecimento destes indivíduos em relatar ao médico, bem como no momento de responder ao questionário durante a coleta, eventuais manifestações

clínicas durante o período de ausência. Portanto, um acompanhamento mais prolongado destes indivíduos, bem como a expansão do tamanho amostral torna-se necessária para a confirmação ou não dos resultados obtidos.

Neste estudo, os indivíduos que tinham o alelo mutante para o SNP rs1207568 apresentaram níveis médios elevados de albumina quando comparados àqueles homozigotos selvagens, o que pode significar uma maior taxa de filtração glomerular nestes indivíduos com alelo selvagem para o SNP rs1207568, evento clínico importante na DF (HIRSCHBERG, 2010). Esta associação também foi investigada em uma população de idosos caucasianos hospitalizados, mas sem registro de significância estatística entre indivíduos mutantes e selvagens para este SNP quanto aos níveis séricos de albumina (PARONI *et al.*, 2012). Estes autores verificaram associação significativa entre os níveis de albumina e outro SNP no gene *KI*, o rs9536314, o qual não foi objeto do presente estudo.

Os indivíduos portadores do alelo mutante para o SNP rs9527025 tiveram níveis médios elevados de fósforo e BD quando comparados aos indivíduos com o alelo selvagem. A literatura não tem demonstrado estes tipos de associação, mas é bem descrito o aumento dos níveis séricos de fósforo diante de polimorfismos no gene *KI*, dado que a proteína Klotho possui atividade fosfatúrica, sendo sua falta um fator limitante para tal atividade (NAKATANI *et al.*, 2009). O fósforo é um elemento encontrado em pequenas quantidades no fluido extracelular, sendo predominante em deposições ósseas e dentárias, além de ocorrer nos espaços intracelulares no interior de mitocôndrias, onde participa da fosforilação oxidativa, bem como no retículo endoplasmático, sendo requerido para a fosforilação de proteínas, participando, portanto, de mecanismos variados de sinalização intracelular. Este elemento também ocorre no núcleo, participando da síntese dos ácidos nucleicos, no complexo de Golgi e lisossomos (RAZZAQUE, 2011). A hiperfosfatemia grave está envolvida com calcificação vascular extensa e de tecidos moles, acometendo pulmão, rins, aorta (NAKATANI *et al.*, 2009), o que induz uma associação entre hiperfosfatemia e mortalidade. Essas calcificações ectópicas a nível vascular podem ser consideradas um fator agravante ao considerarmos os eventos vaso-oclusivos na DF, uma vez que uma maleabilidade menor dos vasos poderia proporcionar mais oclusão vascular.

Na DF ocorre a hemólise extravascular, a partir da remoção dos eritrócitos danificados pelo sistema retículo-endotelial. Entretanto, tem-se considerado a importância da hemólise intravascular para o desenvolvimento da doença. Durante a hemólise intravascular, a

hemoglobina liberada no plasma forma dímeros que se ligam à haptoglobina, e este conjunto é passível do reconhecimento por macrófagos e monócitos, via CD163. O heme ferroso também é liberado no plasma, sendo oxidado a heme férrico, ocasião na qual ele é liberado da hemoglobina e se associa à hemopexina, para a posterior degradação hepática, da qual resultam tanto a biliverdina, a qual será convertida a BI e em seguida a BD, e o ferro livre (ZAGO *et al.*, 2001; ROTHER *et al.*, 2005). Embora não tenha ocorrido associação significativa entre o SNP rs9527025 e outros marcadores de hemólise, a associação com a BD sugere a existência de alguma relação entre a presença deste SNP no gene *Kl* e a gravidade da DF.

O potássio foi avaliado neste estudo por ser um dos elementos que se encontram alterados diante de polimorfismos no gene *Kl*, cuja deficiência na expressão do seu produto proteico conduz a uma retenção maior de potássio no organismo (CHA *et al.*, 2009). No grupo de pacientes estudado, apenas 2,02% dos indivíduos apresentaram níveis séricos de potássio superiores aos valores de referência. Contudo, este elemento foi positivamente correlacionado com a contagem global de leucócitos, linfócitos típicos, monócitos, plaquetas e com a concentração de PCRe e ferritina. Na HbSC, a presença do co-transporte K-Cl ativado favorece o efluxo maior de K^+ e água dos eritrócitos, desidratando as células contendo HbC, o que induz a polimerização da HbS, colaborando de forma expressiva com os eventos clínicos da doença (ROMERO *et al.*, 2004). Este efluxo de K^+ , somado àquele proveniente da própria hemólise, bem como da ativação de leucócitos e plaquetas pode contribuir para esta associação positiva entre a contagem destes elementos e os níveis do eletrólito. Sabe-se que os indivíduos com DF exibem quadro inflamatório crônico (MORRIS *et al.*, 2005), apresentando tanto em momentos de crise quanto em condições basais contagens elevadas de leucócitos, sendo este marcador considerado como fator de risco para morte precoce nestes indivíduos (PLATT *et al.*, 1994; OKPALA, 2006). A contagem de plaquetas e a PCRe (marcador inflamatório clássico) também aparecem aumentadas na doença, mesmo considerando-se o estado estável dos indivíduos. Diante desta condição inflamatória e de desequilíbrio homeostático crônico, há uma estimulação para a liberação de citocinas que causam o aumento da ativação e das propriedades adesivas destas células e de eritrócitos ao endotélio, propiciando eventos vaso-oclusivos (AKINOLA *et al.*, 1992; OKPALA, 2006; VILLAGRA *et al.*, 2007). A ferritina também é uma proteína de fase aguda, encontrando-se elevada em condições inflamatórias e na DF, sendo também um marcador de gravidade nestes indivíduos

(AKIMBAMI *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem o envolvimento do potássio no desenvolvimento do quadro inflamatório crônico e de desequilíbrio homeostático da DF.

Entre os resultados alcançados no presente estudo, os níveis de PTs foram positivamente correlacionados com os níveis de potássio. Após a busca bibliográfica, não localizamos descrição semelhante na literatura. Com base no conhecimento de que os níveis séricos de PTs podem estar aumentados sobretudo em condições de desidratação, no mieloma múltiplo, no lúpus eritematoso sistêmico e nas inflamações crônicas, formulamos a hipótese de que uma possível elevação das PTs nos pacientes analisados pode estar associada a um quadro de desidratação, uma vez que nestas circunstâncias pode ocorrer acidose e, conseqüentemente, prejuízo no funcionamento de bombas de sódio-potássio, o que conduz à elevação do potássio extracelular, sendo esta uma possível explicação para a correlação positiva significativa descrita. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados, com vistas na elucidação dos mecanismos associados ao potássio e as conseqüências de suas alterações sistêmicas.

Nós encontramos a correlação positiva entre os níveis de potássio e o colesterol total e com o Col-LDL. Não há relatos desta associação na literatura em indivíduos com DF. Entretanto, níveis elevados de colesterol, sobretudo a fração Col-LDL, quando associados, entre outros, a níveis pressóricos elevados, têm sido relacionados a riscos maiores para a ocorrência de aterosclerose e doença cardíaca (TAKEUCHI *et al.*, 2005). Isto pode significar alguma participação do potássio na promoção de eventos ateroscleróticos, os quais representam risco aumentado de eventos vaso-oclusivos nestes indivíduos.

A contagem de hemácias e as concentrações de HbF foram negativamente correlacionados com os níveis de potássio, ao passo que houve correlação positiva deste marcador com as concentrações de HbS. Estes dados sugerem a associação do potássio com a gravidade clínica dos pacientes com DF. As contagens diminuídas de hemácias estão associadas à perda de quantidades destes glóbulos devido à hemólise. Por outro lado, concentrações diminuídas de HbF também são consideradas como fator de risco para morte precoce nestes indivíduos em estado estável, havendo aumento na expectativa de vida quando suas concentrações estão elevadas (PLATT *et al.*, 1994). Isto porque a HbF nos eritrócitos de indivíduos com DF inibe a polimerização da HbS, com redução da concentração desta Hb. Além disso, o híbrido formado entre os dois tipos de Hb ($\alpha 2\beta^S\gamma$) não pode se unir ao polímero de HbS, inibindo a falcização, evento importante para o desencadeamento das manifestações

clínicas da doença (AKINSHEYE *et al.*, 2011). Dada a capacidade da HbS em formar polímeros que darão origem às hemácias falcizadas sob condições de desoxigenação, a correlação positiva encontrada entre seus níveis e os de potássio reforçam os possíveis efeitos do potássio na gravidade da doença.

O potássio também foi positivamente correlacionado com o fósforo neste estudo. O fósforo é outro um marcador que se encontra elevado diante de defeitos na expressão do gene *K1*, e está envolvido com calcificações ectópicas (LAU *et al.*, 2010), conforme já mencionado. Esta correlação positiva entre o potássio e o fósforo sugere, portanto, que o potássio pode ter algum envolvimento no desenvolvimento de danos ao endotélio vascular, por intermédio do fósforo, porém tal hipótese necessita de estudos adicionais para confirmação.

No presente estudo, houve correlação positiva entre os níveis de fósforo sérico e a contagem de eosinófilos e linfócitos típicos. Alguns autores sugerem a participação do fósforo na redução da absorção intestinal de magnésio, causando a depleção nos níveis séricos deste elemento e, com isto, o aumento na contagem global de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos (HARDWICK *et al.*, 1991; VAN ORDEN *et al.*, 2006), mecanismo que pode contribuir para o perfil inflamatório crônico nestes indivíduos. Somado a isto, o fósforo também teve correlação positiva com a contagem de plaquetas. O que se sugere é que o aumento da contagem de plaquetas encontrado nestes indivíduos, conforme já comentado, está associado à sua maior ativação e agregação, contribuindo para o aumento nos níveis séricos de fósforo, visto que durante a ativação e agregação plaquetária ocorre a secreção do conteúdo de seus grânulos alfa e densos, sendo que estes últimos são ricos em fósforo (SKAER *et al.*, 1976; MESA, 2000).

O fósforo teve correlação negativa com as concentrações de Hb e o Ht, sugerindo sua associação ao quadro anêmico, além da correlação positiva com o AST, o qual, assim como a Hb, a DHL e a arginase, é liberado no plasma mediante a hemólise intravascular (KATO *et al.*, 2006), embora esta aminotransferase também seja liberada no plasma em situações que cursam com danos teciduais no coração, fígado, músculo esquelético, rins e cérebro. Em contrapartida, os níveis séricos de fósforo foram negativamente correlacionados aos níveis de BI na população estudada, o que remete às características inerentes aos pacientes incluídos no presente estudo, uma vez que os indivíduos com HbSC não possuem uma hemólise grave quando comparada à daqueles com AF. Outras complicações também foram consideradas como graves em populações semelhantes a incluída no nosso estudo, a exemplo da

osteonecrose, retinopatia e a STA, sendo atribuído ao aumento da densidade celular e da viscosidade sanguínea (NAGEL, *et al.*, 2003). Ressaltamos que no presente estudo, o fósforo também esteve associado positivamente aos níveis dos marcadores de lesão hepática ALT e FAL, o que também pode estar relacionado ao acometimento a órgãos nestes indivíduos.

Nos indivíduos com DF, a insuficiência renal encontra-se entre os principais danos crônicos a órgão que conduzem a taxas elevadas de hospitalização, bem como à morte precoce (POWARS *et al.*, 2005). Entretanto, apenas três indivíduos apresentavam valores de uréia maiores que 40 mg/dL (limite superior do valor de referência para o marcador) e nenhum deles apresentou níveis séricos elevados de creatinina. Somado a isto, observou-se a associação negativa entre os níveis de fósforo e a creatinina. Isto sugere que os níveis séricos de fósforo podem estar aumentados não pela presença de lesão renal neste grupo de indivíduos, mas, provavelmente, pelos mecanismos de ativação plaquetária previamente abordados. Entretanto, é importante considerar que na DF é comum a hiperfiltração renal (HIRSCHBERG, 2010), fato que pode estar relacionado com os valores diminuídos de creatinina nestes indivíduos.

O cálcio foi positivamente correlacionado aos níveis séricos de PTs e albumina. Não há relatos destas associações na literatura, mas o cálcio percorre a circulação sistêmica em duas frações: a primeira consiste do cálcio ionizado livre e a segunda trata-se da fração de cálcio ligada às proteínas, particularmente a albumina, a proteína mais abundante no plasma (PAYNE *et al.*, 1979). Isto explica a correlação positiva encontrada entre o cálcio e as PTs e albumina. O cálcio está envolvido em várias funções no organismo. Entre elas, o cálcio é capaz de ativar a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase (NADPH oxidase) de forma indireta, a partir da ativação da proteína cinase C, induzindo a produção elevada de EROs em eritrócitos de indivíduos com AF, contribuindo para o estresse oxidativo, eventos vaso-oclusivos e danos a órgãos (GEORGE *et al.*, 2013). Entretanto, no presente estudo, o cálcio não foi correlacionado a nenhum marcador de hemólise.

Uma correlação negativa entre o cálcio e a ASLO foi observada neste estudo. Não há relatos desta correlação na literatura. Possivelmente trata-se de uma associação sem significância clínica, tendo-se em vista que o cálcio extracelular tem sido identificado em níveis elevados em sítios de infecção e de inflamação livre de patógeno, sendo um importante ativador de inflamossomos e caspase-1, o que acarreta um aumento da conversão da pro-IL-1 β em sua forma ativa IL-1 β e, conseqüente, aumento do dano celular, fato que não confirma

a associação descrita (ROSSOL *et al.*, 2012). Entretanto, estudos relacionados ao metabolismo do cálcio em pacientes com HbSC devem ser desenvolvidos visando esclarecer a pertinência de tal correlação.

A VitD participa tanto no controle da homeostasia mineral e óssea, quanto na modulação sobre o sistema imune, conforme já abordado (LIU *et al.*, 2006; HANSDOTTIR *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; ADAMS *et al.*, 2009; ADAMS, 2010). Neste trabalho, os níveis séricos de VitD foram positivamente relacionados a contagem de linfócitos típicos e concentrações de PCR_e. Nenhum trabalho já abordou esta associação entre a VitD e a PCR_e. Esta proteína hepática de fase aguda, sintetizada a partir da ação de fatores liberados por macrófagos e adipócitos, tais como a interleucina-6 (IL-6) e outras citocinas, encontra-se em níveis elevados em resposta à inflamação e está envolvida na ativação do sistema complemento e na indução da fagocitose por macrófagos (THOMPSON *et al.*, 1999, LAU *et al.*, 2005). Além disso, a PCR_e encontra-se envolvida na atenuação da liberação e produção de ON nas células endoteliais, na diminuição da angiogênese, na indução da produção endotelial de endotelina-1, uma molécula vasoconstrictora, além da IL-6, favorecendo a captação de Col-LDL por macrófagos. A PCR_e também induz aumentos nos níveis das moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e de adesão a célula vascular (VCAM-1), bem como na secreção de proteína quimioatraente de monócitos-1 (VERMA *et al.*, 2002; VERMA *et al.*, 2002b). Estes eventos são importantes para a manutenção do microambiente pró-trombótico e pró-inflamatório, bem como eventos ateroscleróticos, eventos importantes para o desenvolvimento da disfunção endotelial e ativação de leucócitos nos indivíduos com DF. Sugere-se, com isto, que a ativação imunológica promovida pela VitD possa, em conjunção com as proteínas de fase aguda, tais quais a PCR_e, estar envolvida nos mecanismos de vasculopatia na DF.

A VitD também foi correlacionada positivamente com a contagem de reticulócitos, que se eleva como uma resposta compensatória da medula óssea frente à hemólise. Os eritrócitos de indivíduos com AF produzem níveis elevados de EROs pela ação da NADPH oxidase, mecanismo mediado pela proteína cinase C e a RacGTPase, e induzido por citocinas inflamatórias, contribuindo para o dano a órgãos. Os reticulócitos, os quais apresentam maior atividade da NADPH oxidase quando comparados aos eritrócitos maduros, contribuem ainda mais para a produção de EROs, aumentando os danos vasculares (GEORGE *et al.*, 2013). A VitD foi negativamente correlacionada com o VCM, cujo valor encontra-se reduzido nas

anemias microcíticas. Não foram identificados trabalhos na literatura que confirmem tais correlações, mas estes resultados sugerem que a VitD pode estar relacionada com o desencadeamento de eventos hemolíticos nos indivíduos com HbSC, embora esta hipótese precise ser testada.

Entretanto, o presente estudo demonstrou a associação negativa entre a VitD e os níveis de ferro e BD. Diante do fato de que a conversão de BI a BD ocorre a nível hepático (ZAGO *et al.*, 2001), tal mecanismo pode ser prejudicado mediante a presença de dano hepatocelular, o que nos leva a supor que os danos teciduais podem estar implicados na associação negativa encontrada entre os níveis da VitD e BD neste estudo. Suspeitamos, entretanto, que esta correlação entre a VitD e os níveis de ferro e BD poderia ser positiva em uma população de indivíduos HbSS, cujos eventos hemolíticos são mais graves do que nos HbSC, o que torna interessante a investigação dos mecanismos envolvidos na relação entre a VitD e estes dois marcadores, além da comparação destes mecanismos entre indivíduos HbSC e HbSS.

Neste trabalho foi observada a correlação negativa entre os níveis séricos de VitD e PTH. Esta correlação negativa já foi descrita em indivíduos com DF, com relação à 25(OH) vitamina D (MOHAMMED *et al.*, 1993), bem como em outras populações sem a DF, incluindo grupos de homens adultos (HAGSTRÖM *et al.*, 2009), crianças e adolescentes obesos (GILARDINI *et al.*, 2011) e adolescentes e adultos nos EUA (FRASER *et al.*, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2011). Uma explicação para esta correlação negativa é o sistema de regulação existente entre o cálcio, o PTH e a VitD. Diante de reduções nos níveis séricos de cálcio devido ao comprometimento de sua absorção renal sob níveis reduzidos de VitD, ocorre o aumento na expressão do PTH, bem como sua liberação da paratireóide. O PTH ganha então o espaço circulatório, podendo atuar nas células renais, induzindo a expressão de 1α -hidroxilase, e por isto elevando a síntese de $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D. Esta, por sua vez, pode se ligar a elementos responsivos à VitD em células intestinais e ósseas, causando elevações na absorção intestinal de cálcio e fosfato, bem como na liberação de cálcio e fosfato da fase mineral do tecido ósseo, o que contribui, portanto, para o restabelecimento dos níveis séricos de cálcio (ADAMS, 2010).

Tomando-se como base a relação negativa entre os níveis da VitD com os de PTH, bem como a associação positiva encontrada entre os níveis de VitD e a contagem de reticulócitos, pode-se compreender a relação negativa encontrada entre o PTH e a BD e AST,

sugerindo a relação do PTH em associação à VitD, com os eventos de hemólise crônica porém não intensa. Nenhuma destas correlações tem sido descritas na DF. Adicionalmente, como esperado, a contagem de leucócitos, linfócitos típicos e monócitos também tiveram correlação negativa com os níveis de PTH. Estes dados sugerem a relação estreita entre PTH e VitD, onde o PTH induz a síntese renal de VitD e esta inibe a expressão de PTH na paratireóide. Conforme os dados obtidos neste estudo, níveis elevados de VitD estão associados a níveis diminuídos de PTH, sendo que este cenário pode estar relacionado aos eventos de hemólise branda e prolongada e ao perfil inflamatório (o qual, por si só, pode colaborar com a instalação desta forma de hemólise) nestes indivíduos.

O PTH também foi negativamente correlacionado com os níveis de colesterol total e Col-LDL. Tais correlações não têm sido descritas em indivíduos com DF, mas um trabalho avaliando a associação de 25(OH) vitamina D, PTH e cálcio com fatores de risco para doença cardiovascular em adolescentes demonstrou a associação inversa entre o PTH e o Col-LDL e triglicerídeos (WILLIAMS *et al.*, 2011). No presente estudo, os níveis de colesterol total e sua fração Col-LDL estiveram dentro da faixa de normalidade, em desacordo com os níveis diminuídos destas frações lipídicas em indivíduos com DF descritos na literatura (SHORES *et al.*, 2003).

A insuficiência nos níveis de VitD foi observada em nosso estudo. Tal insuficiência também foi descrita na HbSS em 93% dos indivíduos investigados por ROVNER e colaboradores (2008). Com relação à deficiência da vitamina, nenhum indivíduo apresentou tal condição. Sobretudo, a literatura tem relatado a deficiência de VitD em indivíduos com DF, sendo que esta deficiência tem sido relacionada ao hiperparatireoidismo e ao aumento no risco de fraturas, além de ser dependente da estação do ano e da dieta (BUISSON *et al.*, 2004; ADEWOYE *et al.*, 2008; CHAPELON *et al.*, 2009; JACKSON *et al.*, 2012; ARLET *et al.*, 2013). Nossa amostra de indivíduos não apresentou associação significativa entre nenhum dos quatro SNPs no gene *Kl* estudados e a VitD, mas não se pode descartar a hipótese de que algum outro SNP neste gene possa estar presente nestes indivíduos. Polimorfismos no gene *Kl* têm reflexos na regulação da expressão de VitD, sendo que deficiências nos níveis da proteína Klotho conduzem a hipervitaminose D. Os níveis séricos da proteína Klotho não foram dosados, o que poderia ser um dado importante, em adição a uma análise de sequenciamento do gene *Kl* nestes indivíduos, revelando se deficiências nos níveis da proteína Klotho estão envolvidas na manutenção dos níveis de VitD fora dos valores considerados deficientes, em

associação à interferência da dieta. A interferência da estação do ano, todavia, não seria um fator de grande impacto nesta amostra, visto que as coletas de sangue dos indivíduos se estenderam por todo o ano de 2011, perfazendo todas as estações.

A **Figura 22** sintetiza as interações propostas a partir dos resultados obtidos neste estudo, no que diz respeito à relação entre SNPs no gene *Klotho*, bem como os níveis de potássio, cálcio, fósforo, vitamina D e paratormônio, com as alterações inerentes à Hemoglobinopatia SC.

Os haplótipos dos genes da globina β não apresentaram associação com SNPs no gene *Kl* nem com os níveis de potássio, cálcio, fósforo, VitD e PTH. Não há trabalhos na literatura que tenham explorado a existência de tais associações. Os haplótipos dos genes da globina β são moduladores da DF, visto que os níveis de HbF variam conforme o haplótipo apresentado pelo indivíduo, como observado nas concentrações elevadas de HbF para os haplótipos SEN e CAM, os quais apresentam gravidade clínica menor. Por sua vez, a gravidade maior ocorre nos indivíduos com haplótipo CAR, seguido do BEN, que possuem quadro clínico intermediário (GONÇALVES *et al.*, 2003; STEINBERG, 2005; SANKARAN, 2013). Neste estudo, os haplótipos identificados foram em sua maioria o BEN/I e BEN/II, seguido do CAR/I e CAR/II, sendo descrito apenas quatro indivíduos com o haplótipo CAR/III. O número maior de indivíduos com haplótipo BEN da globina β^S já foi previamente identificado na população nordestina (ADORNO, *et al.*, 2008). No nosso estudo, a falta de associação destes haplótipos com SNPs no gene *Kl* e com os níveis de potássio, cálcio, fósforo, VitD e PTH sugere que as alterações promovidas por estes parâmetros não têm relação com o efeito modulador da HbF nos indivíduos estudados. Entre os quatro indivíduos com haplótipo CAR/III, foram observadas alterações características de gravidade no que diz respeito à hemólise, o envolvimento vascular, e dano a órgãos, em acordo com o observado na literatura para os haplótipos CAR. Com relação aos níveis séricos menores de creatinina e globulina nos indivíduos com haplótipos CAR, quando comparados àqueles com haplótipos BEN, evidencia-se mais uma vez a gravidade maior nos indivíduos com haplótipos CAR, nos quais pode estar ocorrendo hiperfiltração renal, com consequente perda de creatinina e globulina, reduzindo os níveis séricos destes componentes no soro destes indivíduos.

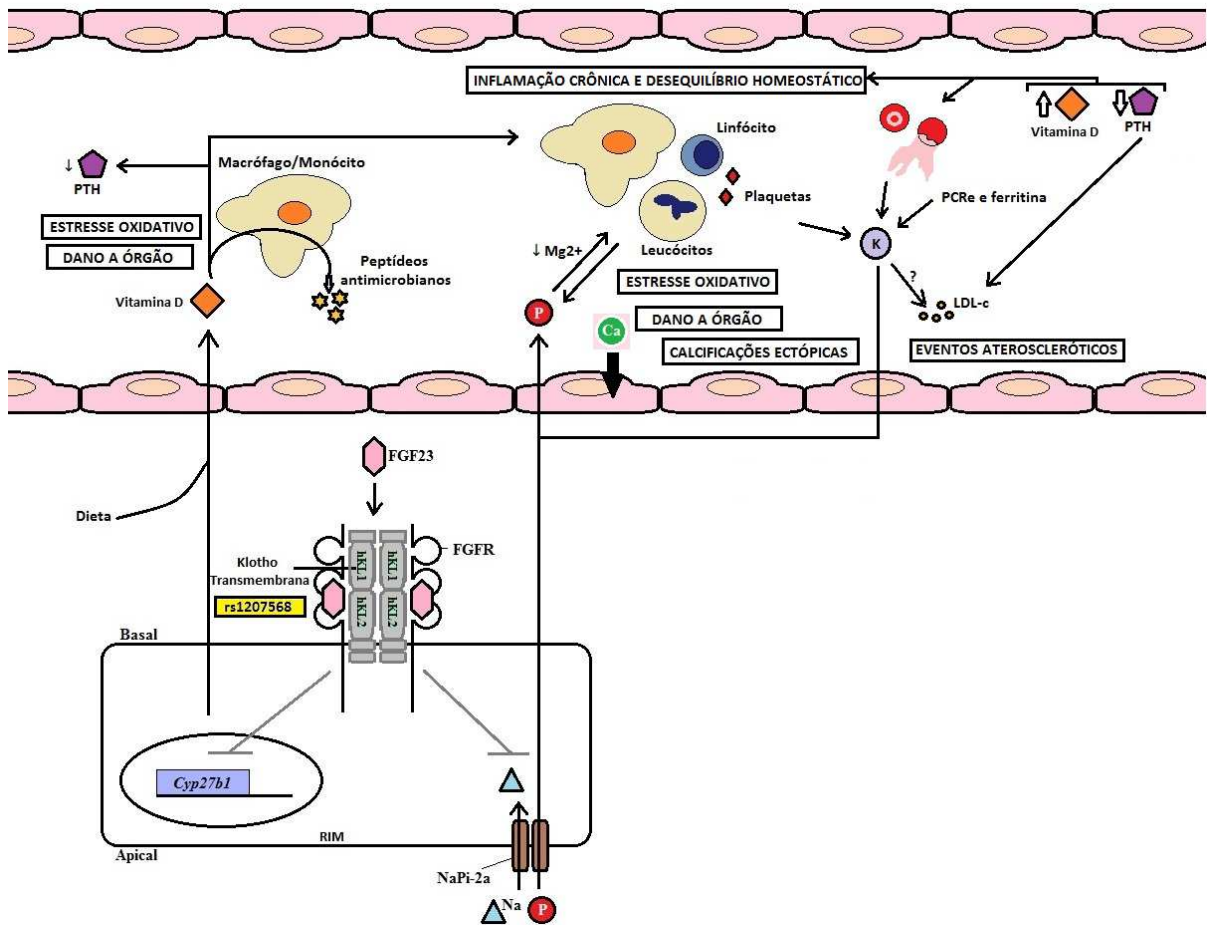


Figura 22: Resumo das interações propostas a partir dos resultados obtidos neste estudo, no que diz respeito à relação entre SNPs no gene *Klotho*, bem como os níveis de potássio, cálcio, fósforo, vitamina D e paratormônio, com as alterações inerentes à Hemoglobinopatia SC. FGF23 = Fator de crescimento de fibroblasto-23. FGFR = Receptor do fator de crescimento de fibroblasto-23. NaPi-2a = Co-transportador de sódio-fosfato tipo-2a. Na = Sódio. P = Fósforo. PTH = Paratormônio. Mg²⁺ = Magnésio. Ca = Cálcio. K = Potássio. LDL-c (Col-LDL) = Colesterol - Lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein*).

8 CONCLUSÕES

- De acordo com os dados obtidos no presente estudo, o SNP rs1207568 no gene *Kl* atua como um fator protetor contra infecções nos indivíduos HbSC, a partir da manutenção dos níveis de VitD em valores não deficientes. Por outro lado, o SNP rs648202 está relacionado ao uso de medicamentos para o controle da doença, remetendo a gravidade maior nos indivíduos que apresentam este SNP.
- SNPs no gene *Kl* podem promover um risco aumentado de dano vascular, tendo em vista a sua associação com níveis elevados de fósforo, sendo um fator agravante para a DF. Embora a literatura relate seu envolvimento com o endotélio vascular, nem todos os SNPs no gene *Kl* se mostram como uma ferramenta precisa para a avaliação do risco nos indivíduos com HbSC, onde a dosagem da proteína Klotho torna-se uma ferramenta possivelmente mais exata neste propósito, sendo este um objeto interessante de investigação.
- O potássio tem correlação positiva com componentes homeostáticos e inflamatórios na HbSC, atuando como um fator estimulante para as propriedades adesivas de componentes do sangue ao endotélio. Sua correlação positiva com o colesterol total e com o Col-LDL sugere a participação do potássio na promoção de eventos ateroscleróticos nestes indivíduos.
- O fósforo também teve associação com a anemia hemolítica e dano a órgãos, além da sua relação com o perfil inflamatório e o desequilíbrio homeostático crônico destes pacientes, sendo um importante fator a ser considerado no monitoramento destes indivíduos.
- O cálcio, embora seja um fator importante em processos inflamatórios, não contribuiu para uma gravidade maior nos indivíduos investigados no presente estudo.
- A VitD e o PTH também podem ser dosados nos indivíduos com HbSC para o monitoramento do estado pró-trombótico e pró-inflamatório destes pacientes, predizendo o risco de vasculopatia. Estes fatores podem ser relevantes também na avaliação do estado hemolítico e no risco de danos a órgãos nos indivíduos HbSC.
- Os SNPs no gene *Kl*, bem como o potássio, cálcio, fósforo, VitD e PTH atuam de forma independente dos haplótipos dos genes da globina β sobre o quadro clínico dos indivíduos com HbSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.S.; REN, S.; LIU, P.T.; *et al.* Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. **J. Immunol.**, v. 182, n. 7, p. 4289-4295, 2009.

ADAMS, J.S.; HEWISON, M. Update in vitamin D. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 2, p. 471-478, 2010.

ADEWOYE, A.H.; CHEN, T.C.; MA, Q.; *et al.* Sickle cell bone disease: response to vitamin D and calcium. **Am. J. Hematol.**, v. 83, n. 4, p. 271-274, 2008.

ADORNO, E.V.; COUTO, F.D.; MOURA NETO, J.P.; *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad. Saude Publica**, v. 21, n. 1, p. 292-298, 2005.

ADORNO, E.V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; *et al.* Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 31, n. 3, p. 621-625, 2008.

AIGNER, C.P.; SANDRINI, F.; DUARTE, E.G.; *et al.* Estudo do perfil de hemoglobinas em 9.189 testes realizados no Alvaro Centro de Análises e Pesquisas Clínicas. **RBAC**, v. 38, n. 2, p. 107-109, 2006.

AIZAWA, H.; SAITO, Y.; NAKAMURA, T.; *et al.* Downregulation of the *Klotho* Gene in the Kidney under Sustained Circulatory Stress in Rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, p. 865-871, 1998.

AKINBAMI, A.A.; DOSUNMU, A.O.; ADEDIRAN, A.A.; *et al.* Serum ferritin levels in adults with sickle cell disease in Lagos, Nigeria. **J. Blood. Med.**, v. 4, p. 59-63, 2013.

AKINOLA, N.O.; STEVENS, S.M.; FRANKLIN, I.M.; *et al.* Subclinical ischemic episodes during the steady state of sickle cell anemia. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 10, p. 902-906, 1992.

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

AQUINO, S.L.; GAMSU, G.; FAHY, J.V.; *et al.* Chronic pulmonary disorders in sickle cell disease: findings at thin-section CT. **Radiology**, v. 193, n. 3, p. 807-811, 1994.

ARLET, J.B.; COURBEBASSE, M.; CHATELLIER, G.; *et al.* Relationship between vitamin D deficiency and bone fragility in sickle cell disease: a cohort study of 56 adults. **Bone**, v. 52, n. 1, p. 206-211, 2013.

BALDWIN, C.; NOLAN, V.G.; WYSZYNSKI, D.F.; *et al.* Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 372-375, 2005.

BEN-DOV, I.Z.; GALITZER, H.; LAVI-MOSHAYOFF, V.; *et al.* The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 12, p. 4003-4008, 2007.

BLOCH, L.; SINESHCHEKOVA, O.; REICHENBACH, D.; *et al.* Klotho is a substrate for alpha-, beta- and gamma-secretase. **FEBS Lett**, v. 583, n. 19, p. 3221-3224, 2009.

BUISSON, A.M.; KAWCHAK, D.A.; SCHALL, J.; *et al.* Low vitamin D status in children with sickle cell disease. **J. Pediatr.**, v. 145, n. 5, p. 622-627, 2004.

CHA, S.K.; ORTEGA, B.; KUROSU, H.; *et al.* Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. **PNAS**, v. 105, n. 28, p. 9805–9810, 2008.

CHA, S.K.; HU, M.C.; KUROSU, H.; *et al.* Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. **Mol. Pharmacol.**, v. 76, n. 1, p. 38-46, 2009.

CHANG, Q.; HOEFS, S.; VAN DER KEMP, A.W.; *et al.* The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 490-493, 2005.

CHAPELON, E.; GARABEDIAN, M.; BROUSSE, V.; *et al.* Osteopenia and vitamin D deficiency in children with sickle cell disease. **Eur. J. Haematol.**, v. 83, n. 6, p. 572-578, 2009.

CHEN, C.D.; PODVIN, S.; GILLESPIE, E.; *et al.* Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 104, n. 50, p. 19796-19801, 2007.

CHIANG, E.Y.; FRENETTE, P.S. Sickle Cell Vaso-Occlusion. **Hematology/oncology Clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.

CLARKE, G.M.; HIGGINS, T.N. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8B, p. 1284–1290, 2000.

DANN, W.J. The vitamin D content of red palm oil. **Biochem. J.**, v. 26, n. 1, p. 151-154, 1932.

ELLIOTT, L.; ASHLEY-KOCH, A.E.; DE CASTRO, L.; *et al.* Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 137, n. 3, p. 262-267, 2007.

FRASER, A.; WILLIAMS, D.; LAWLOR, D.A. Associations of serum 25-hydroxyvitamin D, parathyroid hormone and calcium with cardiovascular risk factors: analysis of 3 NHANES cycles (2001-2006). **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13882, 2010.

GALIZA NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GEORGE, A.; PUSHKARAN, S.; KONSTANTINIDIS, D.G.; *et al.* Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 2099-2107, 2013.

GILARDINI, L.; PASQUALINOTTO, L.; DI MATTEO, S.; *et al.* Factors associated with early atherosclerosis and arterial calcifications in young subjects with a benign phenotype of obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 8, p. 1684-1689, 2011.

GONÇALVES, M.S.; BOMFIM, G.C.; MACIEL, E.; *et al.* Beta S-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

HAGSTRÖM, E.; HELLMAN, P.; LARSSON, T.E.; *et al.* Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. **Circulation**, v. 119, n. 21, p. 2765-2771, 2009.

HANSDOTTIR, S.; MONICK, M.M.; HINDE, S.L.; *et al.* Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense. **J. Immunol.**, v. 181, n. 10, p. 7090-7099, 2008.

HARDWICK, L.L.; JONES, M.R.; BRAUTBAR, N.; *et al.* Magnesium absorption: mechanisms and the influence of vitamin D, calcium and phosphate. **J. Nutr.**, v. 121, n. 1, p. 13-23, 1991.

HIGGS, D.R.; ENGEL, J.D.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. **Lancet**, v. 379, p. 373-383, 2012.

HIRSCHBERG, R. Glomerular hyperfiltration in sickle cell disease. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, n. 5, p. 748-749, 2010.

HU, M.C.; SHI, M.; ZHANG, J.; *et al.* Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. **FASEB J.**, v. 24, n. 9, p. 3438-3450, 2010.

IMURA, A.; IWANO, A.; TOHYAMA, O.; *et al.* Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. **FEBS Lett.**, v. 565, n. 1-3, p. 143-147, 2004.

JACKSON, T.C.; KRAUSS, M.J.; DEBAUN, M.R.; *et al.* Vitamin D deficiency and comorbidities in children with sickle cell anemia. **Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 29, n. 3, p. 261-266, 2012.

KATO, G.J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R.F.; *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, 2006.

KOH, N.; FUJIMORI, T.; NISHIGUCHI, S.; *et al.* Severely Reduced Production of Klotho in Human Chronic Renal Failure Kidney. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 1015–1020, 2001.

KULOZIK, A.E.; WAINSCOAT, J.S.; SERJEANT, G.R.; *et al.* Geographical survey of β S-globin gene haplotypes: Evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 39, n. 2, p. 239–244, 1986.

KURO-O, M.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; *et al.* Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, v. 390, p. 45-51, 1997.

KUROSU, H.; OGAWA, Y.; MIYOSHI, M.; *et al.* Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 10, p. 6120-6123, 2006.

LAU, D.C.; DHILLON, B.; YAN, H.; *et al.* Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 288, n. 5, p. H2031-2041, 2005.

LAU, W.L.; FESTING, M.H.; GIACHELLI, C.M. Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. **Thromb. Haemost.**, v. 104, n. 3, p. 464-470, 2010.

LAWRENCE, C.; HIRSCH, R.E.; FATALIEV, N.A.; *et al.* Molecular Interactions Between Hb a-G Philadelphia, HbC, and HbS: Phenotypic Implications for SC a-G Philadelphia Disease. **Blood**, v. 90, n. 7, p. 2819-2825, 1997.

LI, S.A.; WATANABE, M.; YAMADA, H.; *et al.* Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. **Cell Struct. Funct.**, v. 29, n. 4, p. 91-99, 2004.

LIU, P.T.; STENGER, S.; LI, H.; *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-1773, 2006.

LIU, H.; FERGUSSON, M.M.; CASTILHO, R.M.; *et al.* Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. **Science**, v. 317, n. 5839, p. 803-806, 2007.

LIU, P.T.; SCHENK, M.; WALKER, V.P.; *et al.* Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5810, 2009.

MASUDA, H.; CHIKUDA, H.; SUGA, T.; *et al.* Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice. **Mech. Ageing Dev.**, v. 126, n. 12, p. 1274-1283, 2005.

MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; SHIRAKI-IIDA, T.; *et al.* Identification of the Human *Klotho* Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted *Klotho* Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, p. 626-630, 1998.

MESA, M.G.; ALFONSO, C.C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. **Rev. Cubana Angiol. y Cir. Vasc.**, v. 1, n. 2, p. 132-141, 2000.

MIZUNO, I.; TAKAHASHI, Y.; OKIMURA, Y.; *et al.* Upregulation of the klotho gene expression by thyroid hormone and during adipose differentiation in 3T3-L1 adipocytes. **Life Sciences**, v. 68, p. 2917-2923, 2001.

MOHAMMED, S.; ADDAE, S.; SULEIMAN, S.; *et al.* Serum calcium, parathyroid hormone, and vitamin D status in children and young adults with sickle cell disease. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 30, p. 45-51, 1993.

MORRIS, C.R.; KATO, G.J.; BLACKWELDER, W.C.; *et al.* Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension and Mortality in Sickle Cell Disease. **JAMA**, v. 294, n. 1, p. 81–90, 2005.

NAGAI, R.; SAITO, Y.; OHYAMA, Y.; *et al.* Endothelial dysfunction in the *klotho* mouse and downregulation of *klotho* gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 5, p. 738-746, 2000.

NAGEL, R.L.; FABRY, M.E.; STEINBERG, M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Reviews**, v. 17, p. 167-178, 2003.

NAKATANI, T.; SARRAJ, B.; OHNISHI, M.; *et al.* In vivo genetic evidence for *klotho*-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. **FASEB J.**, v. 23, n. 2, p. 433-441, 2009.

NOLAN, V.G.; BALDWIN, C.; MA, Q.; *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in *klotho* with priapism in sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 128, n. 2, p. 266-272, 2005.

NOLAN, V.G.; ADEWOYE, A.; BALDWIN, C.; *et al.* Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in *Klotho*, *TEK* and genes of the TGF-beta/BMP pathway. **Br. J. Haematol.**, v. 133, n. 5, p. 570-578, 2006.

OHYAMA, Y.; KURABAYASHI, M.; MASUDA, H.; *et al.* Molecular Cloning of Rat *klotho* cDNA: Markedly Decreased Expression of *klotho* by Acute Inflammatory Stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, p. 920–925, 1998.

OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 13, n. 1, p. 40-44, 2006.

PARONI, G.; SERIPA, D.; PANZA, F.; *et al.* Klotho locus, metabolic traits, and serum hemoglobin in hospitalized older patients: a genetic association analysis. **Age (Dordr.)**, v. 34, n. 4, p. 949-968, 2012.

PAYNE, R.B.; CARVER, M.E.; MORGAN, D.B. Interpretation of serum total calcium: effects of adjustment for albumin concentration on frequency of abnormal values and on detection of change in the individual. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, p. 56-60, 1979.

PLATT, O.S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F.; *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, 1994.

POWARS, D.R.; CHAN, L.S.; HITI, A.; *et al.* Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. **Medicine (Baltimore)**, v. 84, n. 6, p. 363-376, 2005.

RAZZAQUE, M.S. Phosphate toxicity: new insights into an old problem. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 120, n. 3, p. 91-97, 2011.

ROMERO, J.R.; SUZUKA, S.M.; NAGEL, R.L.; *et al.* Expression of HbC and HbS, but not HbA, results in activation of K-Cl cotransport activity in transgenic mouse red cells. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2384-2390, 2004.

ROSSOL, M.; PIERER, M.; RAULIEN, N.; *et al.* Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. **Nat. Commun.**, v. 3, n. 1329, 2012.

ROTHER, R.P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; *et al.* The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293, n. 13, p. 1653-1662, 2005.

ROVNER, A.J.; STALLINGS, V.A.; KAWCHAK, D.A.; *et al.* High risk of vitamin D deficiency in children with sickle cell disease. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 108, n. 9, p. 1512-1516, 2008.

SAITO, Y.; YAMAGISHI, T.; NAKAMURA, T.; *et al.* Klotho Protein Protects against Endothelial Dysfunction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, p. 324–329, 1998.

SAITO, Y.; NAKAMURA, T.; OHYAMA, Y.; *et al.* In Vivo *klotho* Gene Delivery Protects against Endothelial Dysfunction in Multiple Risk Factor Syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, p. 767–772, 2000.

SANKARAN, V.G.; ORKIN, S.H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harb. Perspect Med.**, v. 3, n. 1, p. a011643, 2013.

SEBASTIANI, P.; SOLOVIEFF, N.; HARTLEY, S.W.; *et al.* Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. **Am. J. Hematol.**, v. 85, n. 1, p. 29–35, 2010.

SHIMADA, T.; KAKITANI, M.; YAMAZAKI, Y.; *et al.* Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n. 4, p. 561–568, 2004.

SHIRAKI-IIDA, T.; AIZAWA, H.; MATSUMURA, Y.; *et al.* Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. **FEBS Letters**, v. 424, p. 6-10, 1998.

SHORES, J.; PETERSON, J.; VANDERJAGT, D.; *et al.* Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 95, n. 9, p. 813-817, 2003.

SKAER, R.J.; EMMINES, J.P.; PETERS, P.D. Platelet dense bodies: a quantitative microprobe analysis. **J. Cell Sci.**, v. 20, n. 2, p. 441-457, 1976.

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

TAKESHITA, K.; FUJIMORI, T.; KUROTAKI, Y.; *et al.* Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. **Circulation**, v. 109, n. 14, p. 1776-1782, 2004.

TAKEUCHI, H.; SAITOH, S.; TAKAGI, S.; *et al.* Metabolic syndrome and cardiac disease in Japanese men: applicability of the concept of metabolic syndrome defined by the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III to Japanese men--the Tanno and Sobetsu Study. **Hypertens. Res.**, v. 28, n. 3, p. 203-208, 2005.

THOMPSON, D.; PEPYS, M.B.; WOOD, S.P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. **Structure**, v. 7, n. 2, p. 169-177, 1999.

TSUJIKAWA, H.; KUROTAKI, Y.; FUJIMORI, T.; *et al.* Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. **Mol. Endocrinol.**, v. 17, n. 12, p. 2393-2403, 2003.

ULUG, P.; VASAVDA, N.; AWOGBADE, M.; *et al.* Association of sickle avascular necrosis with bone morphogenic protein 6. **Ann. Hematol.**, v. 88, n. 8, p. 803-805, 2009.

URAKAWA, I.; YAMAZAKI, Y.; SHIMADA, T.; *et al.* Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 770-774, 2006.

VAN ORDEN, R.; EGGETT, D.L.; FRANZ, K.B. Influence of graded magnesium deficiencies on white blood cell counts and lymphocyte subpopulations in rats. **Magnes. Res.**, v. 19, n. 2, p. 93-101, 2006.

VERMA, S.; WANG, C.H.; LI, S.H.; *et al.* A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, v. 106, n. 8, p. 913-919, 2002.

VERMA, S.; LI, S.H.; BADIWALA, M.V.; *et al.* Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. **Circulation**, v. 105, n. 16, p. 1890-1896, 2002b.

VILLAGRA, J.; SHIVA, S.; HUNTER, L.A.; *et al.* Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 2166-2172, 2007.

WILLIAMS, D.M.; FRASER, A.; LAWLOR, D.A. Associations of vitamin D, parathyroid hormone and calcium with cardiovascular risk factors in US adolescents. **Heart**, v. 97, n. 4, p. 315-320, 2011.

YAMAMOTO, M.; CLARK, J.D.; PASTOR, J.V.; *et al.* Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 45, p. 38029-38034, 2005.

YOSHIDA, T.; FUJIMORI, T.; NABESHIMA, Y. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 683-689, 2002.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; p. 243-244, 2001.

APÊNDICES

- I** Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para menores de 18 anos.
- II** Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para maiores de 18 anos.
- III** Questionário aplicado aos pacientes durante a entrevista precedente à coleta.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA MENORES DE 18 ANOS

Você está sendo convidado a consentir com a participação do menor _____, no estudo chamado: “**Modulação Genética da Anemia Falciforme**”, uma vez que oficialmente é o seu representante legal.

A participação do menor é totalmente voluntária e a sua permissão pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

A anemia falciforme é uma doença genética muito comum na população de Salvador, sendo que o indivíduo doente apresenta crise de dor, decorrente da oclusão das veias com as células em formato de foice, podendo também possuir infecção e outros tipos de doenças, como alteração nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

O objetivo deste trabalho é investigar as células sanguíneas e o seu conteúdo genético no sangue de indivíduos com a anemia falciforme, visando a identificação de marcadores ou substâncias que possam ser utilizados como prognóstico dos sintomas clínicos da doença e posteriormente servir no futuro para estudos de novas terapias ou tratamentos. Tendo em vista os motivos apresentados, convidamos o menor acima citado a participar desta pesquisa.

Os registros da participação do menor no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes e de prontuário, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução Res. CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para que o menor participe deste estudo implicará na retirada de 5 ml de sangue, para que possamos realizar o estudo das células do sangue e do DNA. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuírem para conhecimentos novos relacionados à doença.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como formação de hematomas, sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir estes riscos. Nas amostras coletadas serão realizados estudos das células do sangue e do DNA. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e avaliação periódica do menor.

A participação do menor no estudo não trará benefícios, mas possibilitará a busca de informações referentes à anemia falciforme, obtendo dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento dos pacientes e na implantação de políticas de saúde.

Assinatura do responsável _____

Data ___/___/___



Nome do responsável (letra de forma)

Endereço _____

Assinatura Testemunha 1 _____

RG _____

Assinatura Testemunha 2 _____

RG _____

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

* Ana Paula Almeida de Souza – Pesquisadora responsável pelo projeto.
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

* Cynara Gomes Barbosa – Pesquisadora responsável pelo projeto.
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

* Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO
PARA MAIORES DE 18 ANOS

Você está sendo convidado a participar do estudo chamado: “**Modulação Genética da Anemia Falciforme**”.

A sua participação é totalmente voluntária e a sua permissão pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

A anemia falciforme é uma doença genética muito comum na população de Salvador, sendo que o indivíduo doente apresenta crise de dor, decorrente da oclusão das veias com as células em formato de foice, podendo também possuir infecção e outros tipos de doenças, como alteração nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

O objetivo deste trabalho é investigar as células sanguíneas e o seu conteúdo genético no sangue de indivíduos com a anemia falciforme, visando a identificação de marcadores ou substâncias que possam ser utilizados como prognóstico dos sintomas clínicos da doença e posteriormente servir no futuro para estudos de novas terapias e tratamentos. Tendo em vista os motivos apresentados, nós o convidamos a participar desta pesquisa.

Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes e de prontuário, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução Res. CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para a sua participação neste estudo implicará na retirada de 5 ml de sangue, para que possamos realizar o estudo das células do sangue e do DNA. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuírem para conhecimentos novos relacionados à doença.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como formação de hematomas, sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir estes riscos. Nas amostras coletadas serão realizados estudos das células do sangue e do DNA. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao seu acompanhamento clínico e avaliação periódica.

A sua participação no estudo não trará benefícios, mas possibilitará a busca de informações referentes à anemia falciforme, obtendo dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento dos pacientes e na implantação de políticas de saúde.

Assinatura do voluntário _____

Data ___/___/___



Nome do voluntário (letra de forma)

Endereço _____

Assinatura Testemunha 1 _____

RG _____

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

* Ana Paula Almeida de Souza – Pesquisadora responsável pelo projeto.
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

* Cynara Gomes Barbosa – Pesquisador responsável pelo projeto.
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

* Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

**QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PACIENTES PORTADORES DE
HEMOGLOBINOPATIA SC OU RESPONSÁVEL**

Nome: _____ Telefone: _____

Endereço: _____

Idade: _____

Data de nascimento: _____ Profissão: _____

01. Data do primeiro diagnóstico de Hemoglobinopatia SC _____

02. Já esteve internado? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes ? _____

03. Já teve pneumonia? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes ? _____

04. Já teve crise de sequestro esplênico? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes ? _____

05. Já teve AVC? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes ? _____

06. Esplenectomizado? () SIM () NÃO

07. Você tem asma? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas crise nos últimos 06 meses ? _____

08. Tem crise de dor? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes ? _____ Quando foi a última _____

09. Faz uso de alguma medicação? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, qual / frequência? _____

10. Fez uso de profilaxia antibiótica? () SIM () NÃO

11. Completou o calendário vacinal? () SIM () NÃO

12. Faz uso de terapia transfusional? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, quantas vezes ao ano? _____

13. Possui outra patologia? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, qual? _____

14. Tem outros familiares com Hemoglobinopatia SC?

() SIM () NÃO Quem? _____

15. Você trabalha? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, Trabalha com algum tipo de substância química? Qual? _____

16. Você manipula diretamente esta substância?

() SIM () NÃO

Com que frequência? _____

17. Faz uso de bebida alcoólica? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, frequência ? _____

18. Você fuma? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, frequência? _____

19. Faz uso de outro tipo de droga? () SIM () NÃO

Em caso de SIM, frequência ? _____

20. Data da próxima consulta no HEMOBA? _____

21 Dados do prontuário:

Hb =

Ht =

Leuco =

Plaq =

Ferritina =

Reticulócitos =

LDH =

Eletroforese Hb =