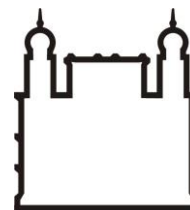




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA HUMANA E EXPERIMENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS ASSOCIADOS
AO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NA ANEMIA FALCIFORME**

LUCIANA MAGALHÃES FIUZA

Salvador – Bahia

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS ASSOCIADOS
AO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL NA ANEMIA FALCIFORME**

LUCIANA MAGALHÃES FIUZA

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

Co-orientadora: Msc. Rayra Pereira Santiago

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para a obtenção do título de Mestre.

Salvador – Bahia

2020

**“INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM ANEMIA FALCIFORME COM HISTÓRIA
DE ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL”.**

Luciana Magalhães Fiuza

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 28 de abril de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Cynara Gomes Barbosa

Dra. Cynara Gomes Barbosa
Professora
UFBA

Karine Araújo Damasceno

Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Marilda de Souza Gonçalves

Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisador
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

*“There's nothing you can do that can't be done
Nothing you can sing that can't be sung (...)
Nothing you can make that can't be made
No one you can save that can't be saved
Nothing you can do but you can learn how to be
you in time
It's easy
All you need is love”*

The Beatle

Dedico ao meu tio Derval (*in memmorian*) e ao seu entusiasmo diante de tudo o que eu conquistei.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Davino e Ana Maria, por todo apoio, amor e incentivo;

A minha família, tios, primos e aos meus amigos, que me deram suporte durante toda a minha vida;

A minha orientadora, Dra Marilda de So/uzza Gonçalves, por todo carinho, zelo, suporte pessoal e profissional que recebi durante muitos anos;

A Dr^a Isa Menezes Lyra pelo apoio no acompanhamento clínico dos pacientes;

A minha família acadêmica, Antônio Mateus, Camylla, Caroline, Claverson, Jeanne, Joelma, Milena, Modeste, Rayra, Rodrigo, Sânzio, Silvana, Suellen, Thassila, Thiago, Vitor e Corynne que me deram todo o suporte necessário;

A equipe do LPA, por todo apoio na realização das coletas, em especial à Dr^a Elisângela, Dr^a Júnia, Jean e Natalie;

Aos funcionários da LACTFAR/UFBA, pelo apoio nas coletas;

A todos os amigos, em especial a Gianni Lucca, Joilson Xavier, Jean Alves, Mell Martem e aos colegas da pós-graduação, pela parceria, companheirismo e suporte;

Aos médicos, enfermeiros, técnicos e funcionários da HEMOBA, pela contribuição, imprescindível para a realização desse trabalho;

Aos pacientes com anemia falciforme, pela compreensão e pelo apoio. Desejo força e resiliência para que vocês continuem lutando;

A FAPESB e ao CNPq pelo suporte financeiro;

Ao Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-Bahia, por acolher este projeto;

Aos funcionários da biblioteca do Instituto Gonçalo Moniz;

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

FIUZA, Luciana Magalhães. Polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias associados ao Acidente Vascular Cerebral na anemia falciforme. 87 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Pacientes com anemia falciforme (AF) apresentam variabilidade fenotípica elevada, podendo apresentar diversas manifestações clínicas, incluindo o Acidente Vascular Cerebral (AVC). No contexto da AF, o comprometimento das artérias cerebrais está primordialmente associado à inflamação crônica, hemólise e a anemia. **OBJETIVO:** Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar a presença de polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias buscando associar a frequência de tais mutações ao desenvolvimento do AVC em crianças com AF. **METODOLOGIA:** Para isto, foram investigados 66 indivíduos, 24 indivíduos que tiveram AVC, formando o grupo caso, e 42 indivíduos que nunca tiveram AVC, compondo o grupo controle. Foram analisados os parâmetros hematológicos, bioquímicos e o perfil inflamatório, bem como foi analisada a presença de polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias, tais como TNF -308 G>A (rs1800629), *IL1B* +3954 C>T (rs1143634), *IL4* -590 C>T (rs2243250) e *IFNG* +874 T>A (rs2430561). Os marcadores hematológicos, bioquímicos e imunológicos foram investigados através de métodos automatizados e os marcadores genéticos foram identificados pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase e *Restriction Fragment Length Polymorphism*. **RESULTADOS:** Analisando os parâmetros laboratoriais, foi encontrado uma elevada contagem de reticulócitos em indivíduos pertencentes ao grupo caso (p=0,0101). Avaliando os dados laboratoriais, encontramos uma associação entre a dosagem de albumina (p=0,0006), proteínas totais (p=0,0087) e ácido úrico (p=0,0395). Foi encontrada uma associação da presença do polimorfismo -308 G>A no gene do *TNF*, onde o alelo A foi associado à ocorrência do AVC (p=0,430). Uma análise multivariada mostrou uma associação entre a presença do polimorfismo -308 G>A no gene do *TNF* e a ocorrência do AVC (p= 0,016). A frequência de indivíduos mutante para o polimorfismo do gene do *IFNG* esteve elevada nos grupos caso e controle. Foram descritas diferentes associações significativas entre a presença do polimorfismo -590 C>T no gene da *IL4* e alguns parâmetros laboratoriais, como contagem de linfócitos (/mL) (p=0,0152), plaquetas (x10³/mL) (p=0,0203), proteínas totais (%) (0,0227) e bilirrubina direta (mg/dL) (p=0,0054). Analisando os parâmetros laboratoriais no grupo de indivíduos com AVC, foi identificada a associação significativa entre a presença do alelo T no polimorfismo -590 C>T do gene da *IL4* e alguns parâmetros laboratoriais, como VCM (fL) (p=0,0105), HCM (rg) (0,0421), RDW (%) (p= 0,0105), LDL (mg/dL) (p= 0,0351), AST (uL) (p= 0,0292) e bilirrubina total (mg/dL) (p= 0,0468). Além disso, foi encontrada associação entre a dosagem de citocinas pró inflamatórias, como IL-12 (p= 0,0095), IL1-β (p= 0, 0300) e IL-8 (p=

0,0167) em indivíduos com o alelo mutante do polimorfismo -509 C>T no gene da *IL4*. Nenhuma associação estatística foi encontrada entre os parâmetros avaliados a presença dos polimorfismos nos genes da *IL1B* e *IFNG*. **CONCLUSÃO:** Pode-se concluir que pacientes com AF com histórico prévio de AVC apresentam alterações nos parâmetros laboratoriais e apresentam uma maior frequência do alelo A do polimorfismo do- -308 G>A no gene do *TNF*. Além disso, pode-se observar que o polimorfismo -590 C>T no gene da *IL4* esteve associado a alterações em marcadores laboratoriais, alterando o nível de expressão de citocinas inflamatórias. Esses resultados evidenciam a necessidade de se investigar possíveis interferências genéticas, afim de se estabelecer os efeitos de tais variáveis no desfecho do AVC em pacientes com AF.

Palavras chaves: Anemia falciforme; Citocinas Inflamatórias, Acidente Vascular Cerebral, Inflamação.

FIUZA, Luciana Magalhães. Polymorphisms in inflammatory cytokine genes associated with stroke in sickle cell anemia. 87 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Patients with sickle cell anemia (SCA) have high phenotypic variability and have several clinical manifestations, including stroke. In the context of SCA, impairment of the cerebral arteries is primarily associated with chronic inflammation, hemolysis and anemia. **OBJECTIVE:** Thus, the aim of the present study was to identify the presence of polymorphisms in inflammatory cytokine genes, seeking to associate the frequency of such mutations with the development of stroke in children with SCA. **METHODOLOGY:** For this, 66 individuals were investigated, 24 individuals who had a stroke, forming the case group, and 42 individuals who never had a stroke, making up the control group. Hematological, biochemical and inflammatory profile parameters were analyzed, as well as the presence of polymorphisms in inflammatory cytokine genes, such as *TNF* -308 G> A (rs1800629), *IL1B* +3954 C> T (rs1143634), *IL4* - 590 C> T (rs2243250) and *IFNG* +874 T> A (rs2430561). Hematological, biochemical and immunological markers were investigated using automated methods, and genetic markers were identified by polymerase chain reaction and *Restriction Fragment Length Polymorphism* techniques. **RESULTS:** Analyzing the laboratory parameters, a high reticulocyte count was found in individuals belonging to the case group ($p = 0.0101$). Evaluating the laboratory data, we found an association between the dosage of albumin ($p = 0.0006$), total proteins ($p = 0.0087$) and uric acid ($p = 0.0395$). An association of the presence of the -308 G> A polymorphism was found in the *TNF* gene, where the A allele was associated with the occurrence of stroke ($p = 0.430$). A multivariate analysis showed an association between the presence of the -308 G> A polymorphism in the *TNF* gene and the occurrence of stroke ($p = 0.016$). A high frequency of mutants was found for the *IFNG* gene polymorphism. a significant association was observed between the presence of the -590 C> T polymorphism in the *IL4* gene and some laboratory parameters, such as lymphocyte count (/ mL) ($p = 0.0152$), platelets ($\times 10^3$ / mL) ($p = 0, 0203$), total proteins (%) (0.0227) and direct bilirubin (mg / dL) ($p = 0.0054$). Analyzing the laboratory parameters in the group of individuals with stroke, a significant association was identified between the presence of the T allele in the -509 C> T polymorphism of the *IL4* gene and some laboratory parameters, such as CMV (fL) ($p = 0, 0105$), HCM (rg) (0.0421), RDW (%) ($p = 0.0105$), LDL (mg / dL) ($p = 0.0351$), AST (uL) ($p = 0.0292$) and total bilirubin (mg / dL) ($p = 0.0468$). In addition, an association was found between the dosage of pro-inflammatory cytokines, such as IL-12 ($p = 0.0095$), IL-1 β ($p = 0.000$) and IL-8 ($p = 0.0167$) in individuals

with the mutant allele of the -509 C> T polymorphism in the *IL4* gene. No statistical association was found between the parameters evaluated, the presence of polymorphisms in the *IL1B* and *IFNG* genes. **CONCLUSION:** Thus, it can be concluded that patients with AF with a previous history of stroke have changes in laboratory parameters and have a higher frequency of the A of the -308 G> A polymorphism in the *TNF* gene. In addition, it can be seen that the -590 C> T polymorphism in the *IL4* gene was associated with changes in laboratory markers, altering the level of expression of inflammatory cytokines. These results demonstrate the need to investigate possible genetic interferences, in order to establish the effects of such variables on the stroke outcome in patients with SCA.

Key words: Sickle Cell Anemia, Inflammatory Cytokines, Stroke, Inflammation.

LISTA DE SÍMBOLOS

β^S	Alelo beta S
A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação gráfica do fenômeno vaso-oclusivo presente na doença falciforme, mostrando a participação de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, hemácias normais e falcizadas e células endoteliais..... 20

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

ACM	Artéria cerebral media
AF	Anemia falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCi	Acidente vascular cerebral isquêmico
AVCh	Acidente vascular cerebral hemorrágico
BEM	Haplótipo ligado ao grupo de genes da globina beta do tipo Benin
CAM	Haplótipo ligado ao grupo de genes da globina beta do tipo Camarões
CAR	Haplótipo ligado ao grupo de genes da globina beta do tipo Bantu ou República Central Africana
CSSCD	Grupo de estudo cooperativo em doença falciforme, do inglês <i>Cooperative study of sickle cell disease</i>
DF	Doença falciforme
DTC	Doppler Transcraniano
Hb	Hemoglobina
<i>HBB</i>	Gene da globina beta
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSC	Hemoglobinopatia SC
HbSS	Anemia falciforme
HU	Hidroxiuréia
LDH	Lactato Desidrogenase
RDW	Amplitude de distribuição dos eritrócitos, do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>
NO	Óxido Nítrico
SAUDI	Haplótipo ligado ao grupo de genes da globina beta do tipo Índia-Arábia Saudita

SEM	Haplótipo ligado ao grupo de genes da globina beta do tipo Senegal
SNP	Polimorfismos de único nucleotídeo, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STA	Síndrome Torácica Aguda
STOP	Ensaio de prevenção do acidente vascular cerebral na doença falciforme, do inglês <i>Stroke Prevention Trial in sickle cell disease</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Tal- α	Talassemia alfa

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	ANEMIA FALCIFORME.....	16
1.2	ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	17
1.3	INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA ANEMIA FALCIFORME.....	20
1.4	CITOCINAS PRÓ INFLAMATORIAS	22
1.5	FATORES GENÉTICOS E PREDISPOSIÇÃO AO AVC.....	25
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MANUSCRITO	31
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
A –	ARTIGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO	74
A.1	ARTIGO I.....	Erro! Indicador não definido.
A.2	ARTIGO II	Erro! Indicador não definido.
A.3	ARTIGO III.....	Erro! Indicador não definido.
B -	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	81
C -	QUESTIONÁRIO.....	83

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme (AF) é uma anemia hemolítica decorrente de uma mutação de ponto no sexto códon do gene da globina β (*HBB*), onde ocorre a substituição de adenina por timina ($\text{GAT} \rightarrow \text{GTT}$). A substituição não sinônima da base nitrogenada possui implicações na síntese proteica, onde ocorre a troca do aminoácido ácido glutâmico por valina na posição β_6 , produzindo a hemoglobina variante S (HbS). A presença em homozigose do alelo beta S (β^S) em um indivíduo irá caracterizá-lo como possuidor da AF. As modificações genéticas irão promover alterações significativas na dinâmica celular do eritrócito, pois a substituição do aminoácido interfere diretamente no balanço de cargas da molécula de hemoglobina (REES et al., 2010). As moléculas de HbS, em baixas concentrações de oxigênio, tendem a formar longos polímeros de filamentos duplos, o que culmina na alteração da estrutura do eritrócito, que apresentará o formato alongado, característico desta patologia (CONRAN e BELCHER, 2018). As manifestações clínicas na AF são bastante heterogêneas, podendo sofrer influências de diversos fatores, como variáveis genéticas, condições climáticas, sociais e econômicas as quais o indivíduo está submetido (LYRA et al., 2005; BRASIL, 2008).

Um estudo realizado no gene *HBB* evidenciou a existência de duas mutações distintas, detectadas pela ação da enzima de restrição Hpa I, indicando a origem multicêntrica para esta patologia (KAN e DOZY, 1978). Foram identificados os haplótipos, outras variações genéticas no gene *HBB*, as quais possuem implicações diretas no fenótipo do indivíduo com AF (LOGGETTO, 2013). Os haplótipos constituem um padrão de combinação de sítios polimórficos em um determinado cromossomo e são um elemento fundamental para a análise antropológica, bem como são uma ferramenta para o estudo clínico dos pacientes, pois já foi estabelecida a relação direta entre essas variáveis genéticas e a gravidade da AF (GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2003). Foram descritos cinco principais haplótipos do alelo β^S , sendo eles República Centro-Africana (CAR), Benin (BEN), Senegal (SEN), Camarões (CAM) e Índia-Arábia Saudita (SAUDI). Os haplótipos do gene da globina β possuem uma associação com os níveis de hemoglobina fetal (HbF), possuindo, deste modo, uma interferência direta na evolução clínica do indivíduo. Os níveis de HbF constituem um fator importante para o desenvolvimento

clínico dos pacientes com AF, pois interferem diretamente na polimerização da HbS, reduzindo a formação de polímeros no interior do eritrócito. Estudos apontam para o aumento na concentração de HbF nos haplótipos SEN e SAUDI e para sua diminuição nos haplótipos BEN e CAR (LOGGETTO, 2013).

Outro importante fator genético que interfere no perfil clínico dos pacientes com AF é a talassemia-alfa (α) (Tal- α), em especial a deleção de 3.7kb no gene da cadeia α da hemoglobina. Estudos apontam para a frequência de 30% da Tal- α nas populações de indivíduos com AF (KATO et al. 2007; STEINBERG e SEBASTIANI, 2012). Estudos sugerem que o efeito modulador da Tal- α nas manifestações clínicas da AF está associado a redução da concentração intracelular da HbS, reduzindo o dano celular provocado pela polimerização da hemoglobina variante (EMBURY et al., 1984; KATO et al., 2017; RAFFIELD et al., 2018).

Assim, os pacientes com AF apresentam variabilidade fenotípica elevada, podendo apresentar diversas manifestações clínicas, tais como a anemia hemolítica crônica, dores abdominais, dores osteoarticulares, priapismo, infartos pulmonares, trombose, úlceras, infecções recorrentes, crise de sequestro esplênico, síndrome torácica aguda (STA), nefropatia, retinopatia, além de apresentarem risco elevado para a ocorrência de acidente vascular cerebral (AVC) (ILESANMI, 2010).

1.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O AVC é definido pelo *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD) como uma síndrome neurológica aguda decorrente do rompimento ou da oclusão de uma artéria, alterando o funcionamento normal da circulação sanguínea cerebral (BALLAS et al., 2009). Trata-se de uma patologia que tem como causa primária o comprometimento do fluxo sanguíneo de importantes artérias cerebrais, como a carótida interna, cerebral média e cerebral anterior (HOPPE et al., 2007). Atualmente, classifica-se o AVC em dois principais tipos, o AVC isquêmico (AVCi) e o AVC hemorrágico (AVCh). O AVCi é o tipo mais comum, onde ocorre a obstrução vascular, levando a redução da perfusão cerebral (SPENCER, 2013). O segundo tipo mais comum é o AVCh, onde ocorre o rompimento de um vaso sanguíneo cerebral (hemorragia intracerebral) ou em torno da membrana que circunda o cérebro (hemorragia subaracnóide). O AVCi pode evoluir

para um AVCh (transformação hemorrágica), quando ocorre a perda da integridade microvascular, devido à obstrução isquêmica do vaso cerebral.

O AVCi possui uma associação importante com processos inflamatórios, sendo a inflamação considerada como possível fator de causa ou de aumento do risco para a ocorrência de oclusão isquêmica de artérias cerebrais (PALM et al., 2016). Um marcador inflamatório importante, a proteína C reativa, tem tido seus níveis associados à ocorrência do AVC em indivíduos sem AF, indicando que a inflamação sistêmica crônica está diretamente relacionada à oclusão de vasos sanguíneos (MUIR et al., 2007). O estudo de Palm e colaboradores (2016) demonstrou que há uma relação entre a inflamação desencadeada por processos infecciosos e a ocorrência do AVC, onde ficou estabelecido que infecções que promovem um quadro inflamatório sistêmico podem ser consideradas um gatilho para a ocorrência do AVC. Além dos processos infecciosos, inflamações sistêmicas autoimunes são conhecidas por exacerbar o risco para o desenvolvimento do AVC, tais como a doença arteriosclerótica e artrite reumatoide (DHILLON; LIANG, 2015; MUIR et al., 2007).

No contexto da AF, o comprometimento das artérias cerebrais está primordialmente associado à inflamação crônica, hemólise e a anemia (FLANAGAN et al., 2011; WEBB e KWIATKOWSKI, 2013). Além disso, o AVC em indivíduos com AF vem sendo associado ao aumento da viscosidade sanguínea (WEBB e KWIATKOWSKI, 2013). As condições vasculares iniciais para o desenvolvimento do AVC na AF estão associadas à aderência de reticulócitos ao endotélio vascular, o que resulta em danos às células endoteliais, promovendo a sua ativação. Tal fenômeno estimula o recrutamento de mediadores inflamatórios e de plaquetas, gerando um quadro de obstrução aguda vascular (ADAMS, 2007; WEBB e KWIATKOWSKI, 2013).

Indivíduos com AF que desenvolveram o AVC possuem dosagens elevadas de integrinas, E-selectinas, moléculas de adesão solúveis, moléculas pró-coagulantes, fator de von-Willebrand, membros das imunoglobulinas, fibrinogênio e trombina (FRENETTE, 2002). Dados da literatura apontam para a relação íntima entre a anemia hemolítica e o AVC, onde já ficou demonstrado o aumento na velocidade do fluxo sanguíneo cerebral em indivíduos que apresentam quadro grave de anemia hemolítica, pois esses indivíduos manifestam complicações trombóticas, tais como o tromboembolismo *in situ*, trombose pulmonar e AVC (ATAGA, 2009).

Além disso, já foi evidenciado que indivíduos com AF apresentam o quadro inflamatório crônico, evidenciado pela leucocitose. A contagem elevada de leucócitos já foi demonstrada por

estar associada ao aumento da mortalidade, bem como ao aumento da ocorrência de STA e do AVC (CONRAN e BELCHER, 2018). Estudos realizados *in vivo* e em *ex vivo* apontaram que citocinas inflamatórias desempenham papel crucial no desenvolvimento do AVC isquêmico (MUNRO; POBER; COTRAN, 1989; TONG et al., 2013). A inflamação crônica e a ativação do sistema imune inato vêm sendo diretamente associadas ao desenvolvimento do AVC isquêmico (J.; J., 2003; JIN; YANG; LI, 2010; TONG et al., 2013). Assim, a inflamação tem sido considerada um mecanismo essencial para possíveis intervenções terapêuticas no contexto do AVC, devido ao seu papel no desencadeamento das mudanças vasculares que culminam na ocorrência desta manifestação clínica (MUIR et al., 2007).

As consequências do AVC para o indivíduo são imprevisíveis e irão depender do grau de comprometimento dos vasos, bem como da velocidade da intervenção médica no momento da obstrução ou rompimento do vaso sanguíneo. Trata-se de uma condição clínica que eleva a morbidade e mortalidade em indivíduos com AF, acometendo cerca de 10% dos pacientes (ADAMS, 2005; WEBB e KWIATKOWSKI, 2013).

O Doppler Transcraniano (DTC) é um método não invasivo que utiliza o ultrassom para mensurar o fluxo sanguíneo em artérias cranianas pertencentes ao polígono de Willis, indicando alterações na dinâmica vascular cerebral (NEWELL e AASLID, 1992). A velocidade do fluxo sanguíneo medida através do DTC indica alterações no diâmetro arterial, onde o aumento da velocidade está diretamente relacionada à presença de estenose cerebral (WEBB e KWIATKOWSKI, 2013). A terapia de transfusão crônica é um método que vem sendo utilizado para prevenir a ocorrência do AVC, bem como diminuir o risco do segundo evento nos indivíduos que já desenvolveram essa patologia (WEBB e KWIATKOWSKI, 2013). A transfusão sanguínea crônica vem se mostrando efetiva na prevenção do AVC, pois esta terapêutica diminui os níveis de hemoglobina livre no plasma e a hemólise (ADAMS, 2007; KATO et al., 2007), além de reduzir os níveis de lactato desidrogenase (LDH), um marcador importante de hemólise intravascular, o qual vem sendo associado ao aumento das velocidades do DTC, sendo considerado atualmente um marcador de risco para o AVC na AF (WEBB e KWIATKOWSKI, 2013).

1.3 INFLAMAÇÃO CRÔNICA NA ANEMIA FALCIFORME

A inflamação crônica é um fenômeno frequentemente descrito em pacientes com AF e a expressão crônica de moléculas inflamatórias está diretamente associada à vaso-oclusão e à hemólise intravascular (CONRAN e BELCHER, 2018). Os processos inflamatórios crônicos estão intimamente relacionados a diversas complicações clínicas, incluindo a auto-esplenomegalia, STA, hipertensão pulmonar, úlceras, nefropatia e o AVC (BALLAS e LUSARDI, 2005; NATH e HEBBEL, 2015). Diversos estudos têm demonstrado que a hemólise é um dos fenômenos que contribui significativamente para o desencadeamento da inflamação crônica na AF. Trata-se de um fenômeno recorrente em indivíduos com AF, estima-se que aproximadamente 30% dos eventos hemolíticos aconteçam no lúmen vascular (GUARDA et al., 2017). Os danos sofridos pela membrana dos eritrócitos nos episódios de falcização tornam o envoltório celular rígido, diminuindo sua capacidade deformatória, o que reduz o seu tempo de vida, gerando o rompimento anormal das hemácias no lúmen vascular (CONRAN e BELCHER, 2018).

A liberação do heme como consequência da oxidação da hemoglobina livre, na hemólise intravascular, contribui para o desencadeamento de uma resposta inflamatória, além de promover lesões no endotélio vascular (GHOSH et al., 2013). O heme tem sido considerado um mediador inflamatório importante, uma vez que esta molécula é capaz de ativar o sistema imune inato, através da via do receptor do tipo Toll (TLR), o TLR4, em monócitos e células endoteliais, podendo induzir a produção do fator de necrose tumoral (TNF) (BELCHER et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2007).

Outro processo fundamental associado ao poder inflamatório da hemólise está relacionado à depleção do óxido nítrico (NO), um radical livre produzido enzimaticamente pela enzima óxido nítrico sintetase (NOs), durante a conversão da arginina em citrulina (KATO, et al., 2017). Durante a hemólise intravascular, ocorre a liberação da arginase, o que irá provocar a diminuição das concentrações de L-arginina, o substrato para a produção de NO (BELISÁRIO et al., 2018). Além disso, a hemoglobina livre interage com o NO, produzindo meta-hemoglobina e nitrato, contribuindo para a depleção do NO (HABARA e STEINBERG, 2016). Assim, os sucessivos eventos de hemólise provocam a depleção nos níveis de NO, provocando alterações vasculares

importantes no indivíduo com AF. Além do seu papel na vaso-dilatação, o NO possui papel fundamental como molécula anti-inflamatória, pois esse radical livre reduz a ativação leucocitária e as interações leucócito-endotélio, além de diminuir a migração de leucócitos para o interior dos tecidos (CONRAN e BELCHER, 2018). Ademais, o NO é capaz de inibir a agregação plaquetária, além de atuar na liberação de citocinas anti-inflamatórias. Assim, a depleção do NO, possui efeitos inflamatórios significativos, sendo considerado fenômeno importante que associa a hemólise intravascular ao desencadeamento de processos inflamatórios na AF. Além disso, eritrócitos falciformes hemolisados liberam outras moléculas capazes de estimular processos inflamatórios, tais como a adenosina tri-fosfato (ATP) (SIKORA et al., 2014) e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (CONRAN e BELCHER, 2018).

Os DAMPS liberados pelos eritrócitos contribuem para a promoção e propagação do estado inflamatório, além de contribuírem para o aumento do estresse oxidativo (KATO, et al., 2017). Os DAMPs decorrentes da hemólise intravascular são capazes de ativar o sistema imune inato, contribuindo para exacerbar o quadro inflamatório encontrado em pacientes com AF (KATO, et al., 2017). O heme e a hemoglobina livres, bem como a liberação do ATP na hemólise contribuem para a ativação plaquetária, aumentando o estado inflamatório e contribuindo para a vasculopatia presente nesses indivíduos (CARDENES et al., 2014). A hemólise intravascular é um mecanismo patológico que possui diversas consequências para o indivíduo com AF, pois além de gerar o quadro anêmico grave, contribui para o estabelecimento da inflamação crônica e gera condições que irão contribuir para a ocorrência dos processos vaso-oclusivos característico dessa patologia (GUARDA et al., 2017).

A adesão de eritrócitos ao endotélio vascular é um dos mecanismos essenciais para a manutenção do perfil inflamatório exacerbado em indivíduos com AF (CONRAN e BELCHER, 2018). Sabe-se que os eritrócitos falciformes apresentam alterações em sua membrana celular, fazendo com que essas hemácias sejam mais aderentes ao endotélio vascular (CONRAN e BELCHER, 2018; MAKIS, et al., 2000). A membrana de eritrócitos de indivíduos com AF possui expressão maior de moléculas de adesão do que hemácias de indivíduos normais (WAUTIER e WAUTIER, 2013). Dados da literatura demonstraram que existe correlação positiva entre a aderência de eritrócitos ao endotélio vascular e a gravidade das manifestações clínicas na AF, evidenciando que o fenômeno da vaso-oclusão é essencial para a ocorrência do estado mais grave da doença (MAKIS, et al., 2000). Assim, diversos mecanismos patológicos

contribuem para a manutenção do estado inflamatório crônico em indivíduos com AF. A Figura 1 mostra o papel dos fenômenos hemolíticos, da lesão endotelial e dos processos inflamatórios na ocorrência da vaso-occlusão na AF. O processo inflamatório em indivíduos com AF é um fenômeno que desencadeia diversas manifestações clínicas e vem sendo considerado um mecanismo importante para intervenções terapêuticas.

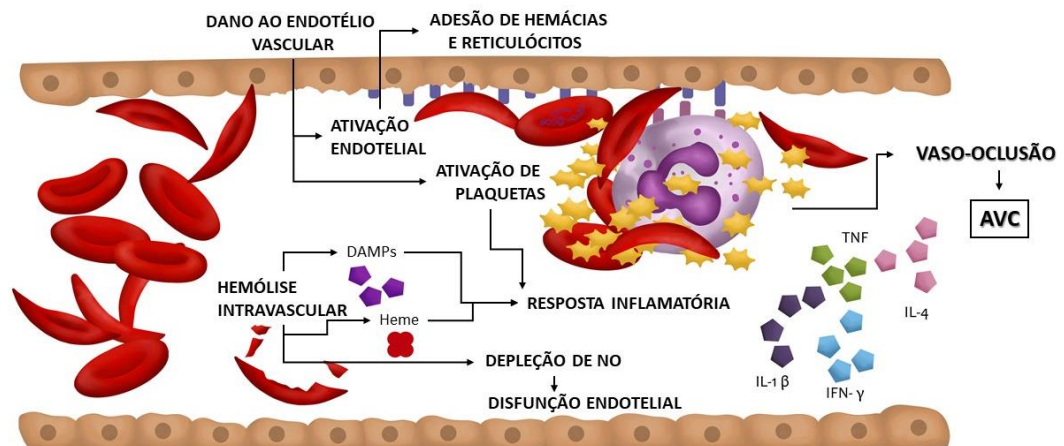


Figura 1. Representação gráfica do fenômeno vaso-oclusivo presente na doença falciforme, mostrando a participação de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, hemácias normais e falcizadas e células endoteliais. Fonte: adaptada de (KATO et al., 2017)

1.4 CITOCINAS PRÓ INFLAMATORIAS

Uma das consequências da anemia hemolítica crônica é o aumento da contagem de reticulócitos na circulação sanguínea (KATO, et al., 2007). A membrana dos reticulócitos apresenta expressão particular de moléculas envolvidas na adesão celular, o que torna essas células mais aderentes ao endotélio vascular (KATO, et al., 2007). A integrina $\alpha4 \beta1$, presente na membrana dos reticulócitos, irá se ligar à fibronectina e à molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) (do inglês *vascular cell adhesion protein 1*) expressas na superfície de células endoteliais (PATHARE et al., 2003).

Estudos sugerem que as citocinas, produzidas nos sítios de inflamação, agem como gatilhos para a adesão celular de reticulócitos, pois essas interações celulares são fortalecidas pela ativação de células endoteliais, que ocorre devido a ação de moléculas, como o TNF e as interleucinas (IL) 1 e 8 (IL-1 e IL-8)(KEIKHAEI et al., 2013; MAKIS; HATZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; PATHARE et al., 2004). Além disso, estudos demonstraram que a expressão de VCAM-1 na superfície de células endoteliais é induzida pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e a interleucina 1 beta (IL-1 β), produzidas por monócitos ativados (BELCHER et al., 2000; PATHARE et al., 2003). Um estudo realizado por Belcher e colaboradores mostrou que o bloqueio da atividade da IL-1 β e do TNF reduz a expressão de moléculas de adesão celular, como a E-selectina e VCAM-1, evidenciando a íntima relação entre os processos inflamatórios e fenômenos vaso-oclusivos na AF (BELCHER et al., 2000).

O TNF é uma citocina de ação pleiotrópica, produzida predominantemente por macrófagos ativados e linfócitos T, o qual poderá ser expresso na membrana celular ou poderá ser liberada, apresentando-se em sua forma solúvel (BRADLEY, 2008). As concentrações de TNF são elevadas em condições infecciosas e inflamatórias, tanto agudas quanto crônicas. Embora os principais produtores de TNF sejam macrófagos e linfócitos T, diversos outros tipos celulares podem produzir esta citocina, como os mastócitos, células NK (*natural killer*), neutrófilos, células endoteliais, células de tecido muscular liso, fibroblastos e osteoclastos (BRADLEY, 2008). As propriedades pró-inflamatórias do TNF podem ser explicadas principalmente com base no seu efeito no endotélio vascular e nas interações entre leucócitos e as células endoteliais. As células do endotélio, em resposta à ação do TNF, expressam moléculas de adesão celular, como a E-selectina, a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e VCAM-1 (BELCHER et al., 2000). Além disso, o TNF participa da indução da trombose intravascular, induzindo a expressão de proteínas pró-coagulantes, como o fator tecidual, e diminuindo a produção da proteína anti-coagulante trombomodulina. Estudos anteriores apontam para a relação entre os níveis plasmáticos de TNF e a ocorrência do AVCi, onde dosagens da citocina foram encontradas mais elevadas em pacientes do que nos indivíduos saudáveis (BOKHARI et al., 2014; WELSH et al., 2008).

A IL-1 β é uma citocina que possui efeitos pró-inflamatórios de estímulos locais e sistêmicos. Possui a função associada a mecanismos inflamatórios crônicos e infecciosos agudos, promovendo o recrutamento de células inflamatórias para os sítios de infecção através da indução

da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e através da liberação de quimiocinas (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). Sua produção ocorre em monócitos e macrófagos e com menos frequência em outros tipos celulares, tais como neutrófilos, células endoteliais, células do epitélio, linfócitos, células do músculo liso e fibroblastos (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010; LOPEZ-CASTEJON e BROUGH, 2011). Os efeitos inflamatórios sistêmicos da IL-1 β desencadeiam a hipotensão, febre, neutrofilia, trombocitose e a produção de proteínas de fase aguda (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010). Além disso, a IL-1 β está associada à regulação da imunidade adaptativa, através da indução da diferenciação de linfócitos Th17 e da produção de IL-17 em camundongos e humanos (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; CHUNG et al., 2009). Estudos realizados em modelos animais mostraram que a IL-1 β possui papel essencial na regulação do fluxo sanguíneo em casos de isquemia cerebral, além de atuar na ativação de células endoteliais do cérebro, estimulando-as a produzir moléculas de adesão e quimiocinas, contribuindo para o recrutamento de células inflamatórias (ASARE et al., 2010).

O interferon gama (γ) (IFN- γ) é uma citocina produzida principalmente por células T e células NK (BILLIAU; MATTHYS, 2009; SCHRODER et al., 2004) e, em menor frequência, por células B, macrófagos e células dendríticas (MEYER, 2009). O IFN- γ possui efeito na regulação da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, interferindo no deslocamento de populações de células do sistema imune para os locais de inflamação (SANVITO et al., 2010). Esta citocina possui efeito na especialização de células T *naive*, atuando, em conjunto com a IL-12, na diferenciação em linfócitos do tipo Th1 (SANVITO et al., 2010) e possui efeito inibidor na diferenciação de células do tipo Th2. Sua ação pró-inflamatória também está associada à estimulação da produção de outros mediadores inflamatórios, como TNF e o NO em macrófagos (SANVITO et al., 2010). A liberação de IFN- γ por linfócitos T e células NK ocorre em resposta à ação de citocinas como a IL-12 e IL-18 (SCHRODER et al., 2004). Embora o IFN- γ esteja intimamente relacionado à resposta imunológica em condições infecciosas, estudos tem mostrado que essa citocina possui uma função associada a processos inflamatórios crônicos e autoimunes, como já fora descrito em doenças como a artrite reumatoide (LEE et al., 2017) e o lúpus (MEYER, 2009).

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina produzida em linfócitos T-CD4, mastócitos, eosinófilos e basófilos. Atua diretamente nos linfócitos T, B, em células NK e em células endoteliais (GADANI et al., 2012). Possui efeito na diferenciação de linfócitos B, induzindo-os a

produzir imunoglobulinas G e E, os quais irão atuar nas respostas alérgicas e anti-helmínticas (GADANI et al., 2012). Suas propriedades anti-inflamatórias estão associadas à sua atuação em macrófagos ativados, onde reduz os efeitos das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF, IL-6 e IL-8, além de inibir a produção de radicais livres de oxigênio. Embora os mecanismos pelos quais a IL-4 atua em resposta aos processos inflamatórios na AF permaneçam pouco elucidados, estudos já demonstraram o aumento na expressão dessa citocina em indivíduos em estado estável (MAKIS; HATZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000). Estudos têm mostrado que as alterações nas respostas anti-inflamatórias podem ter efeito significativo nos processos inflamatórios ocorridos no AVC isquêmico.

1.5 FATORES GENÉTICOS E PREDISPOSIÇÃO AO AVC

Embora a etiologia do AVC na AF ainda permaneça pouco conhecida, estudos prévios realizados em irmãos indicam a predisposição genética para o desenvolvimento desta manifestação clínica (DRISCOLL et al., 2003; WEBB e KWIATKOWSKI, 2013). Possíveis genes candidatos têm sido associados ao risco do desenvolvimento do AVC, tais como genes envolvidos em processos inflamatórios, metabolismo lipídico, regulação da pressão sanguínea, lesão endotelial e trombose (HOPPE et al., 2007). Estudos anteriores têm sugerido que alterações na expressão do gene do *TNF* podem ter impacto direto na predisposição ao AVC em crianças com doença falciforme (DF), devido à sua participação na inflamação vascular, marcada pela ativação endotelial e de monócitos (BELISÁRIO et al., 2018; HOPPE et al., 2007). Além disso, a expressão elevada do *TNF* tem sido associada a outras condições inflamatórias, como a artrite reumatoide e a sepse (HAJEER e HUTCHINSON, 2001; HOPPE et al., 2007).

O polimorfismo -308G/A na região promotora do gene do *TNF* (rs1800629) é conhecido por alterar a expressão desta molécula, o que pode influenciar na resposta inflamatória do paciente. O efeito da presença do polimorfismo *TNF* -308G>A é variável entre as populações, indicando a necessidade de se replicar à análise desta mutação em diferentes modelos populacionais (BELISÁRIO et al., 2018; HOPPE et al., 2007). O gene da *IL4* está localizado no braço longo do cromossomo 5 (q23-31), com localização próxima a genes de citocinas associadas a respostas do tipo Th2 em processos alérgicos, tais como a IL-5 e IL-13. O polimorfismo *IL4* -

590C/T tem sido associado a doenças de caráter inflamatório crônico, como a artrite reumatoide e lúpus (HUSSEIN et al., 2013; PARK et al., 2017). A presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (*single nucleotide polymorphism*) tem sido associada à diminuição dos níveis plasmáticos da IL-4 (MORENO et al., 2007). Estudos têm sugerido que a presença do polimorfismo *IL4* -590C/T está diretamente associada à gravidade da doença, na artrite reumatoide, indicando o papel desta citocina na redução dos processos inflamatórios crônicos característicos da patologia (MORENO et al., 2007; HUSSEIN et al., 2013; LI et al., 2014).

A presença do polimorfismo intrônico na posição +3954 C>T no gene da *IL1B* (rs1143634) pode trazer consequências funcionais para a expressão do gene, interferindo na resposta do indivíduo a condições inflamatórias. Dados da literatura apontam para a associação entre a presença do polimorfismo e o aumento na susceptibilidade e na gravidade das respostas inflamatórias crônicas em diversas condições clínicas. Estudos feitos em pacientes com artrite reumatoide evidenciaram o aumento na gravidade da doença associada à presença do alelo variante para o polimorfismo *IL1B* +3954 C>T (BUCHS et al., 2001). Outros estudos apontaram para a associação entre a presença da mutação e o aumento da susceptibilidade à úlcera duodenal e periodontite (GALBRAITH et al., 1999; GARCIA-GONZALEZ et al., 2001), indicando que a presença do SNP pode exacerbar a resposta inflamatória nessas condições patológicas.

No contexto da AF, estudos já demonstraram que as concentrações plasmáticas da IL-1 β estão elevadas em indivíduos em crise (ASARE et al., 2010; CARVALHO et al., 2018; PATHARE et al., 2004; QARI; DIER; MOUSA, 2012), indicando a importância de se averiguar outras possíveis condições que podem exacerbar a síntese dessa citocina e as consequências dessa hiperexpressão nas manifestações clínicas decorrentes de respostas inflamatórias. O polimorfismo no gene do *IFNG* na posição +874 T>A, onde ocorre a substituição de adenina por timina, tem sido associado ao aumento da expressão desta citocina. Dados da literatura apontam que o alelo T está associado ao aumento da expressão da molécula, enquanto o alelo A está associado a redução nos níveis plasmáticos (PRAVICA et al., 2000).

Embora muitos estudos associem a presença de polimorfismos à ocorrência do AVC, os mecanismos pelos quais tais variáveis genéticas estão associadas a esta manifestação clínica ainda permanecem desconhecidos. A influência de tais mutações na expressão das citocinas varia de acordo com as populações (HAJEER; HUTCHINSON, 2001; LIBREGTS et al., 2011). Estudos desenvolvidos em diferentes grupos populacionais apontam para resultados divergentes,

indicando que os polimorfismos podem exacerbar ou diminuir a síntese das citocinas (HOPPE et al., 2001). Devido à complexidade dos mecanismos que podem culminar no desenvolvimento do AVC, é importante considerar que diversos genes possam contribuir para a ocorrência dessa manifestação clínica, o que evidencia a necessidade de se pesquisar tais alterações genéticas em conjunto, investigando como esses polimorfismos podem, de forma sinérgica, estar contribuindo para desencadear os eventos que precedem a oclusão das artérias cerebrais em indivíduos com AF.

2 JUSTIFICATIVA

Os dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal apontam que no Brasil ocorre o nascimento de cerca de 3.500 crianças por ano com AF ou 1/1.000 nascidos vivos e 200 mil portadores do traço falciforme (BRASIL, 2009). O estado da Bahia apresenta a maior frequência brasileira para a HbS, tendo sido encontrada a frequência de 14,7% do genótipo AS (HbAS) em 1.200 crianças em idade escolar (AZEVEDO et al., 1980), variando de acordo com o grupo populacional estudado. Adorno e colaboradores (2005), ao estudarem recém-nascidos em Salvador-Bahia, descreveram a frequência de 9,8% para indivíduos HbAS e a prevalência de 0,9% para aqueles com hemoglobinopatia SC (HbSC) e 0,2% para aqueles com AF. Os dados da triagem neonatal no estado da Bahia mostram a prevalência de DF na razão de 1:650 nascidos vivos (BRASIL, 2009).

A evolução da AF é marcada por um amplo espectro de complicações clínicas, que atingem a maioria dos órgãos e aparelhos. Algumas dessas complicações não reduzem a expectativa de vida do paciente, embora possam comprometer consideravelmente a qualidade de vida, tais como: úlceras de pernas, retinopatia, osteonecrose (especialmente da cabeça do fêmur) e cálculos biliares. Outras alterações, no entanto, comprometem diretamente a função de órgãos vitais e estão diretamente associadas a risco de vida. Como a STA, a insuficiência renal e o AVC (ILESANMI, 2010).

O AVC, previamente definido como uma síndrome neurológica aguda secundária a oclusão de uma artéria ou hemorragia, com isquemia, sintomas e sinais neurológicos (BALLAS et al., 2009), é uma complicação grave, de consequências debilitantes. Dados da literatura têm demonstrado que o AVC acomete 11% dos pacientes com AF (ADAMS, 2005). A visão mais holística mais recente da AF analisa a hemácia e suas anormalidades em contexto mais amplo, avaliando a forma com que os eritrócitos interagem, estimulam e geram danos ao endotélio vascular, aos tecidos e às células adjacentes. Assim, os tecidos não estão apenas em hipóxia, como também estão expostos à ação de mediadores inflamatórios (PLATT, 2000).

As citocinas são mediadores inflamatórios que participam na comunicação celular atuando em vias pró e anti-inflamatórias. A expressão de tais moléculas pode sofrer influência de variáveis genéticas, as quais podem exacerbar ou diminuir sua síntese. Alteração nos níveis de expressão das citocinas podem ter efeito direto na resposta inflamatória do indivíduo, podendo

assim contribuir para a ocorrência do AVC. Desta forma, a investigação do perfil de citocinas em pacientes com AF pode contribuir para a elucidação dos mecanismos pelos quais essas moléculas influenciam no quadro clínico do paciente, podendo também contribuir para o desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar polimorfismos em genes de moléculas inflamatórias associando-os as características laboratoriais apresentadas por indivíduos com AF que desenvolveram eventos de AVC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os perfis hematológico, bioquímico e imunológico em indivíduos com AF com e sem AVC prévio;
- Investigar a presença dos polimorfismos nos genes da *interleucina 4 (IL4)*, do *fator de necrose tumoral (TNF)*, da *interleucina 1-beta (IL1B)* e do *interferon-gama (IFNG)* em indivíduos com AF com e sem AVC prévio;
- Avaliar quantitativamente a presença das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12 e TNF, associando-as aos perfis laboratoriais e genéticos nos indivíduos com AF com e sem AVC prévio investigados.

4 MANUSCRITO

Título: Associations between polymorphisms in cytokine genes and laboratory parameters in sickle cell anemia children with stroke

Autores: Luciana M Fiuza, Caroline C da Guarda, Rayra P Santiago, Setondji Cocou Modeste Alexandre Yahouedehou, Corynne S Adanho, Antonio Mateus J Oliveira, Camylla V B Figueiredo, Suellen P Carvalho, Rodrigo M Oliveira, Cleverson A Fonseca, Milena M Aleluia, Isa M Lyra, Valma M L Nascimento, Larissa C Rocha, Marilda S Gonçalves.

Situação: A ser submetido

Objetivo: (referente aos três objetivos específicos da dissertação):

- Investigar os perfis hematológico, bioquímico e imunológico em indivíduos com AF com e sem AVC prévio;
- Investigar a presença dos polimorfismos nos genes da *interleucina 4 (IL4)*, do *fator de necrose tumoral (TNF)*, da *interleucina 1-beta (IL1B)* e do *interferon-gama (IFNG)* em indivíduos com AF com e sem AVC prévio;
- Avaliar quantitativamente a presença das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12 e TNF, associando-as aos perfis laboratoriais e genéticos nos indivíduos com AF com e sem AVC prévio investigados.

Principais resultados: Quando comparamos os parâmetros laboratoriais entre os indivíduos com história prévia de AVC e o grupo controle, identificamos que os indivíduos com história prévia de AVC apresentaram contagem elevada de reticulócitos e níveis diminuídos de albumina, proteínas totais e ácido úrico em relação ao grupo controle. Na análise genética, identificamos que o alelo A do gene *TNF* foi associado à ocorrência de AVC, esse dado ainda foi corroborado através de análise multivariada que encontrou a mesma associação. O polimorfismo no gene *IL4* foi associado à contagem de linfócitos e plaquetas e aos níveis de plaquetócrito e bilirrubina direta. Analisando os polimorfismos nos indivíduos com AVC prévio, nós identificamos que a presença do alelo T do polimorfismo no gene da *IL4* foi associado aos níveis de VCM, HCM,

RDW, LDL, AST e bilirrubina total. Além disso, os indivíduos com o alelo T ainda apresentaram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-1 β e IL-8, indicando a associação desse SNP a um estado pró-inflamatório da AF. Nossos resultados sugerem que a hemólise e a inflamação podem estar associados a ocorrência de AVC na população com AF.

Associations between polymorphisms in cytokine genes and laboratory parameters in sickle cell anemia children with stroke

Luciana M Fiuza^{1,2}, Graduated; Caroline C da Guarda^{1,2}, PhD; Rayra P Santiago^{1,2}, Setondji Cocou Modeste Alexandre^{1,2} MSc; Corynne S Adanho¹, PhD; Antonio Mateus J Oliveira^{1,2}, Undergraduated; Camylla V B Figueiredo^{1,2}, MSc; Suellen P Carvalho^{1,2}, MSc; Rodrigo M Oliveira^{1,2}, MSc; Cleverson A Fonseca^{1,2}, Graduated; Milena M Aleluia³, PhD; Isa M Lyra^{4,5} PhD; Valma M L Nascimento⁶, MD; Larissa C Rocha⁶, MD; Marilda S Goncalves^{1,2}, PhD.

¹ Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brasil, CEP 40.296-710;

² Laboratório de Pesquisa em Anemias, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil. Avenida Adhemar de Barros, s/n, Ondina, Salvador, Bahia, Brasil, CEP 40.170-110;

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Bahia, Brasil.

⁴ Serviço de pediatria, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil. Rua Augusto Viana, snº, Canela - Salvador BA - CEP 40110-060;

⁵ Universidade Salvador, Laureate University, Bahia, Brasil. Av. Luís Viana, 3146 - Imbuí, Salvador - BA, 41720-200

⁶ Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), Bahia, Brasil. Ladeira do Hospital Geral, S/N - Brotas, Salvador - BA, 40286-240

Corresponding Author:

Marilda de Souza Goncalves, PhD

Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão 121, Salvador, Bahia, Brasil, CEP. 40.295-001

Tel: 55-71-3176-2226

FAX: 55-71-3176-2326

E-mail: mari@bahia.fiocruz.br

Abstract

Individuals with sickle cell anemia (SCA) exhibit a wide range of clinical manifestations, such as vaso-occlusion, infection and stroke. Stroke is a common neurologic complication in SCA, and has been associated with chronic inflammation, hemolysis, and anemia. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of inflammatory cytokines have been associated with increased risk of stroke. The aim of this study was associate the presence of SNPs in genes of inflammatory cytokines and the occurrence of primary stroke in children with SCA. A cross-sectional study was developed, including 25 SCA children, who had stroke and 63 SCA children who never had a stroke event, composing the control group. We evaluated biochemical and hematological parameters of all individuals. In addition, the presence of the SNPs in the *tumor necrosis factor (TNF)* -308 G>A, *interleukin-4 (IL4)* -590 C>T, *interferon gamma (IFNG)* +874 T>A and *interleukin-1 beta (IL1B)* +3954 C>T genes were investigated in both group. When the laboratory parameters were evaluated we found increased reticulocyte count and decreased albumin, total proteins and uric acid levels in relation to control group. In the genetic analysis, we found a significant association between the presence of A allele of *TNF* gene and the occurrence of stroke. Our multivariate analysis reinforced the association of polymorphism in *TNF* gene with the occurrence of stroke. The polymorphism in *IL4* gene was associated to laboratorial parameters, such lymphocyte and platelets count, total proteins and direct bilirubin. Analyzing the polymorphisms in the stroke group, we found a significant association between the presence of T allele in *IL-4* gene and some laboratorial parameters, such MCV, MCH, RDW, LDL-C, AST and total bilirubin. In addition, individuals with T allele showed a higher level of pro-inflammatory cytokines, such IL-12, IL-1 β and IL-8, indicating that the presence of this SNP is associated with a pro-inflammatory state. Altogether, our findings corroborate hemolysis and inflammation as the underlying pathophysiological mechanisms associated with the occurrence of stroke in SCA individuals.

INTRODUCTION

Individuals with sickle cell anemia (SCA), the most severe form of sickle cell disease (SCD) present a wide range of clinical manifestations, such as priapism, leg ulcer, acute chest pain, pulmonary hypertension, osteonecrosis, pain crisis and stroke (BELCHER et al., 2000; KATO et al., 2007). These clinical manifestations may be influenced by several factors, such as other genetic variables, environment, social and economic conditions (LYRA et al., 2005).

Stroke is a multifactorial neurologic complication and has been considered one of the most severe clinical complications in SCA and a common cause of morbidity and mortality in SCA, affecting about 11% of patients (DRISCOLL et al., 2003; KWIATKOWSKI et al., 2003). Obstruction of the cerebral arteries in SCA is associated with chronic inflammation, hemolysis, and anemia (FLANAGAN et al., 2011; WEBB; KWIATKOWSKI, 2013). Epidemiological analysis and studies with twins, siblings and animals have shown a genetic influence on predisposition to stroke in the general population (HOPPE et al., 2004). Several genes have been investigated for stroke risk in SCA, like genes involved in endothelial injury, thrombosis and inflammation (HOPPE et al., 2007).

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described associated with increased risk of stroke, like mutations in cytokines genes, such tumor necrosis factor (*TNF*), interleukin (IL) *IL1B*, *IL4* and interferon gamma (*IFNG*) (HOPPE et al., 2007). These mutations are known for being associated with other chronic inflammatory pathologies and may be associated with stroke in SCA (AL-MOHAYA et al., 2016; BOZZI et al., 2009; BUCHS et al., 2001; GARCIA-GONZALEZ et al., 2001; HUIZINGA et al., 1997; HUSSEIN et al., 2013; KARAHAN et al., 2005; KUBOTA et al., 1998; PAWLIK et al., 2005; PRAVICA et al., 2000; TINDALL et al., 2010).

SCA is a complex pathological condition and stroke is one of the most serious clinical manifestations. Due to its complexity and the fact that it is multifactorial, the factors that lead to stroke are difficult to investigate. In SCA, chronic inflammation is considered a major factor in stroke, because of this is essential to analyze changes in the inflammatory profile of individuals. Thus, the aim of this study was associate the presence of SNPs in genes of inflammatory cytokines and the occurrence of primary stroke in children with SCA.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A cross-sectional study including 66 unrelated SCA children was developed. Of these, 24 subjects had a previous stroke event, including as cases with an average age of 13.29 ± 4.50 years, whom 14 (56.0 %) were female and 42 SCA children who never had a stroke, composing the control group with an average age of 14.64 ± 3.70 years, whom 17 (27.0 %) were female. The subjects were selected from the Hematology and Hemotherapy Foundation of Bahia State (HEMOBA). Since all individuals were under 18 years, their legal guardians signed the consent form. Samples were collected during the period from 2016 to 2017. Clinical data and demographic data were collected from the patients' medical records. The use of hydroxyurea was questioned in order to evaluate if the use of the drug would interfere with the parameters investigated. All individuals with infectious diseases, hemoglobin profiles not compatible with SCA, and inflammatory episodes during the study were excluded. As part of the treatment to avoid a secondary stroke, the individuals involved in the research, in the case group, were transfused from blood components. The study was approved by Institutional Research Board, (protocol number: 1400535) and was conducted in compliance with the ethical principles established by the revised Declaration of Helsinki. All parents or guardians provided written informed consent followed by the children.

Hematological and biochemical data

Blood samples were collected at the time of enrollment. Hematological parameters were evaluated using a Beckman Coulter LH 780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Brea, California, USA) and blood smears were stained with Wright's stain and examined by light optical microscopy. Reticulocytes were counted after staining supravivally with brilliant cresyl blue dye. Hemoglobin patterns were confirmed by high-performance liquid chromatography employing an HPLC/Variant-II hemoglobin testing system (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Biochemical determinations, including lipid profile, total bilirubin and fractions and lactate dehydrogenase were determined in serum samples using an automated A25 chemistry analyzer (Biosystems S.A, Barcelona, Catalunya, Spain). C-reactive protein (CRP) and alpha-1

antitrypsin (AAT) levels were measured using IMMAGE® Immunochemistry System (Beckman Coulter Inc., Pasadena, California, USA). Laboratory parameters were analyzed at the Clinical Analyses Laboratory of the College of Pharmaceutical Sciences (Universidade Federal da Bahia).

Genetic analysis

About 200uL of peripheral blood was used to extract the genomic DNA from leukocytes using the QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN, USA), according to the laboratory's recommendations. The concentration and the quality of the isolated DNA were evaluated by NanoDrop ND-1000 (ISOGEN LIFE SCIENCE, De Meem, The Netherlands).

The *TNF* -308 G>A (rs1800629), *IL1B* +3954 C>T (rs1143634) and *IL4* -590 C>T (rs2243250) gene polymorphisms were investigated by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphisms (RFLP) techniques. The regions of interest were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following primers: 5'-CCTCCCTGCTGCTCCGA-3' and 5' -AGGCAATAGGTTTTGAGGG-3', for *TNF* gene; 5'-TAAACTTGGGGAGAACATGGT-3' and 5'TGGGGAAAAGATAGAGTAATA-3', for *IL4* polymorphism and 5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' and 5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3 for *IL1B* gene. The *IFNG* +874 T>A gene was investigated by the allele specific PCR, using two sense primers; 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3' (primer A) and 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' (primer T), and one antisense common primer 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'.

Cytokines level measurements

IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12 and TNF plasma concentrations were investigated through particle-based immunoassay using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation Kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The bead population was obtained in a BD FACSAarray™ bioanalyzer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) and the Software FlowJo, LLC (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) was used to analyze the data.

Statistics analysis

The statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 20.0 software (IBM, Armonk, New York, USA) and GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). P values <0.05 were considered significant. The ANOVA, Kruskal Wallis, χ^2 and Fisher Exact test were used. Multivariate binary logistic regression analysis was performed to investigate a possible interaction of the presence of gene polymorphism, hematological and biochemical parameters with the stroke occurrence.

The Hardy-Weinberg Equilibrium (EHW) for each SNP was calculated by the online program calculator at Tufts University, USA (www.tufts.edu). Those with a statistically significant association ($p < 0.05$), when compared to the frequencies expected for each genotype, will be admitted as unbalanced.

RESULTS

Baseline characteristics

Baseline characteristics of SCA children with previous history of stroke and the control group, including the mean \pm standard deviation (SD) of laboratory data were shown in Table 1.

Comparison of hematological and biochemical profiles between stroke and control groups

When the hematological and biochemical laboratory profiles were compared between stroke and control group, we found that individuals with previous history of stroke had decreased albumin ($p = 0.006$), uric acid ($p = 0.0395$) and total proteins ($p = 0.0087$) levels as well as increased reticulocyte counts ($p = 0.0101$) (Figure 1).

Genotype frequencies of polymorphisms in the *TNF*, *IL1B*, *IFNG* and *IL4* genes

An analysis of this sample's genetic data revealed that the genotype frequencies of the polymorphisms (Table 2) in the *TNF* and *IL1B* genes are in Hardy-Weinberg Equilibrium, whereas in the *IFNG* and *IL4* genes are not.

Associations between polymorphisms in the *TNF*, *IL1B*, *IFNG* and *IL4* genes and occurrence of stroke

All polymorphisms were investigated to test whether the inheritance of a variant allele was associated with stroke occurrence. Our analyses revealed that the presence of the polymorphic allele in the *TNF* gene was associated with the occurrence of stroke ($p=0.0430$).

Associations between polymorphisms in the *TNF*, *IL1B*, *IFNG* and *IL4* genes and laboratory parameters in SCA patients

In case and control group, children with variant allele T of -590 C>T polymorphism in *IL4* gene had increased lymphocyte ($p=0.0152$) and platelet ($p=0.0203$) counts in addition to PCT ($p=0.0227$), direct bilirubin ($p=0.0054$), IL1- β ($p=0.0300$), IL-8 ($p=0.0167$) and IL-12 ($p=0.0095$) levels (Figure 2). No statistical association was found between the presence of polymorphism in the *TNF*, *IL1B*, *IFNG* genes and the laboratory parameters evaluated in this study.

Associations between polymorphisms in the *TNF*, *IL1B*, *IFNG* and *IL4* genes and laboratory parameters in the stroke group

In children with previous history of stroke, the variant allele T of -590 C>T polymorphism in *IL4* gene had increased RDW ($p=0.0105$), LDL-C ($p=0.0351$), AST ($p=0.0292$), total bilirubin ($p=0.0468$) and indirect bilirubin ($p=0.0351$) levels as well as decreased MCV ($p=0.0105$) and MCH ($p=0.0421$) levels (Figure 3). No statistical association was found between the presence of polymorphism in the *TNF*, *IL-1 β* , *IFN* genes and the laboratory parameters in the stroke group.

Multivariate analysis

Our multivariate analysis model ($p=0.012$), adjusted for age and sex, was designed to investigate any associations between altered genetic parameters and stroke occurrence. We found that variant allele of *TNF* polymorphism was independently associated with stroke (Table 3).

DISCUSSION

Stroke is a multifactorial clinical complication and has been considered one of the most severe clinical complications in SCA. Many studies have been performed to investigate possible risk factors for the development of stroke in SCA. Sibling-pair studies documented a genetic

contribution to stroke risk in SCA (DRISCOLL et al., 2003; KWIATKOWSKI et al., 2003). In SCA patients, studies demonstrated that specific genetic modifiers may influence the development of cerebrovascular disease (SEBASTIANI et al., 2009; VOETSCH et al., 2007).

Laboratory parameters have been investigated to identify possible risk factors for stroke in SCA. Herein, we found a higher reticulocyte count in the stroke group in comparison to control group, showing a significant association with the occurrence of stroke. Classical studies in SCA stroke patients have demonstrated a significant association between reticulocyte counts and the occurrence of stroke (ADAMS et al., 1994b, 1997). In addition, several studies have confirmed these results (BERNAUDIN et al., 2011; PAVLAKIS et al., 2010; SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011), indicating that high reticulocyte count is an important factor associated with cerebrovascular disease. Prior analyses of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD) identified in a newborn cohort that elevated reticulocyte count have been associated with severe disease and an increased risk of death or stroke (MEIER; WRIGHT; MILLER, 2014). In response to the anemic and hemolytic state, erythropoiesis is increased; leading to reticulocytosis, thus, reticulocyte counts is an important marker of hemolysis (QUINN et al., 2016). Also, is known that chronic transfusion simultaneously reduces the hemolytic rate, reducing the risk of stroke (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; LEZCANO et al., 2006).

We also found an association between previous history of stroke and uric acid levels. High uric acid levels have been associated with inflammasome pathway in individuals with SCA (CERQUEIRA et al., 2011). In addition, children with previous history of stroke had low albumin and total protein levels. Previous reports have described increased total protein and globulin levels in individuals with SCD when compared with controls group (OZGUNES et al., 2015; PANDEY et al., 2012). This hyperproteinemia is a result of hyperglobulinemia, which occurs in these SCD individuals due to erythrocyte destruction during sickling crises (MATTHEW et al., 2012).

Inflammatory responses are associated with numerous complications in SCA, which are caused by many pathological mechanisms, such red blood cells (RBCs) microparticles (MPs) generation (AWOJODU et al., 2014; CONRAN; BELCHER, 2018), intravascular hemolysis (CONRAN; BELCHER, 2018; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017), NO depletion (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017), RBCs alterations and platelet activation (CONRAN; BELCHER, 2018). Previous study has shown that inflammation is an important pathological

process in the arteries of the Willis circle related with stroke occurrence (CHANG MILBAUER et al., 2008). Previous genetic study have found that polymorphism in the promoter region in *TNF* gene, which is a potent pro-inflammatory cytokine, was associated with risk of large vessel stroke in SCA children (HOPPE et al., 2001, 2007). In our population, we found a significant association between the presence of A allele and the stroke occurrence. Cytokines may play a synergistic role in inflammatory pathways, leading to development of stroke, thus, our multivariate analysis revealed that the polymorphism in *TNF* gene may be associated with stroke occurrence. In two recent studies, the *TNF* (-308) A allele was reported to be associated with increased risk of stroke (BELISARIO et al., 2015, 2016; HOPPE et al., 2001). In *TNF* gene, precisely, the effect of SNP in gene expression is still inconclusive. *TNF* -308G>A is the most studied polymorphism of the *TNF* gene, some studies have described that the *TNF* (-308) A allele is a stronger transcriptional activator in vitro increasing gene expression (AL-KHOLY et al., 2016; KROEGER; CARVILLE; ABRAHAM, 1997) while others could not attribute TNF levels to this SNP (HUIZINGA et al., 1997; KUBOTA et al., 1998).

In our population, in case and control group, we found a higher frequency of the mutant A allele in *IFNG* gene. The +874 T>A SNP have been shown different frequencies in various healthy ethnic populations, indicating ethnic effects on this SNP functions (AL-MOHAYA et al., 2016). Previous studies have demonstrated that the *IFNG* (+874) A allele is more frequent than the T allele in several populations (ALBUQUERQUE et al., 2009; EL-BENDARY et al., 2017; GATLIN et al., 2009; GHASEMIAN; SHAHBAZI, 2016; MAHMOUD et al., 2016; PAVLAKIS et al., 2010). In our study, no statistical significance was found between this polymorphism and the stroke occurrence.

IL-4 is a cytokine involved in multiple biologic functions, making difficult to study its effects. Is well known that this cytokine have a role in the differentiation of Th2 cells, driving host responses in parasitic infections and allergic reactions (CHIES; NARDI, 2001; ZAMORANO; RIVAS; PÉREZ-G, 2003). In SCA individuals high levels of Th2 profile cytokines, such IL-4 and IL-10 have been documented (CHIES; NARDI, 2001). Previous study found an increase in the Th2 cytokines levels in SCD steady state patients, but the real effect of this inflammatory molecule in SCD pathology is poorly understood (PATHARE et al., 2004; RAGHUPATHY et al., 2000). In our population, we found a significant association between the presence of the SNP -590 C>T in *IL4* gene and some laboratory parameters, such lymphocyte and

platelets counts, platelecrit and direct bilirubin levels. In addition, we found higher levels of pro-inflammatory cytokines, such IL-12, IL-1 β and IL-8 in individuals with T allele, suggesting that the presence of this SNP is associated with a pro-inflammatory state.

Regarding the stroke group, we found an association between the allele frequencies of *IL4* -590 C>T and decreased mean cell volume as well as mean corpuscular hemoglobin. The RDW, LDL-C, AST, total bilirubin and indirect bilirubin levels were higher in the patients with *IL4* (-590) T allele. In other chronic inflammatory conditions, such rheumatoid arthritis (RA), the T allele was associated to active form of RA (PAWLIK et al., 2005), suggesting that this SNP may contribute to the pro-inflammatory state in the disease. A previous study in patients with positive history of stroke showed a higher frequency of the T allele in case group (WEI et al., 2017), however, our findings were not statistically significant. In our population, we found an association between the T allele and higher levels of Th1 cytokines, indicating that this polymorphism may modulate the pro-inflammatory state, which may contribute to the development of stroke. The results of the association between the T allele and pro-inflammatory cytokine measurement suggest that this polymorphism may be associated with decreased IL-4 expression. Further studies are needed to elucidate the role of the T allele in gene expression in this population. In different populations, the relationship between polymorphism and gene expression levels remains inconclusive, in individuals with RA carriers of the TT genotype present significantly decreased serum IL-4 secretion (BOZZI et al., 2009; HUSSEIN et al., 2013; TINDALL et al., 2010). Nevertheless, different studies indicate a higher expression of cytokine in individuals with the T allele (PARK et al., 2011; TANGTEERAWATANA et al., 2007). These differences can be justified by other genetic variables, the sample size and the ethnic differences of each population.

Due to the reduced number of subjects, our results may be considered preliminary and further studies with large sample sizes could be performed in order to confirm our findings. In addition, the investigation of a genetic risk profile may complement other risk factors, such as transcranial Doppler screening velocities, yet the relevant associations found herein will be useful guiding further studies. The evaluation of multiple factor for early identification of at-risk SCA children could be more effective and lead to appropriate interventions for prevention of stroke.

CONCLUSION

In SCA, chronic inflammation is considered a main factor in stroke development, so is relevant to analyze changes in the inflammatory profile of individuals. Our results suggest that *TNF* -308 G>A polymorphism may be contributing to development of stroke in SCA population. Likewise, we found an association between the presence of T allele in *IL4* gene and the higher levels of pro-inflammatory cytokines, suggesting that this SNP may be increasing the inflammatory response. The explanation for genetic impact in stroke risk may be complex, as one should consider the ethnic interference, genetic linkages, and multifactorial characteristics of stroke. Nonetheless the need to evaluate the multiple factors involved in this clinical manifestation may contribute to early diagnosis and preventive therapeutic interventions, improving patients' life quality.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the HbSS patients and their families for the contribution. We would like to thank also the staffs of the Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) and the Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia for their support in this work. We would like to thank to Dr Ricardo Oliveira Riccio and MSc Kelvin Edson Marques de Jesus for the valuable help with the CBA experiment.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by grants from the Foundation of Research and Extension of Bahia (FAPESB) SUS0034/2013 and 8133/2014 and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (405595/2016-6 and 470959/2014-2) (MSG). SCMAY, RPS, and SPC received scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Finance Code 001. Sponsors of this study are public or nonprofit

organizations that support science in general. They had no role in gathering analyzing, or interpreting the data.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- AL-MOHAYA, M. A. M. et al. Association of genetic polymorphisms in interferon- γ , interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 gene with oral lichen planus susceptibility. **BMC oral health**, v. 16, n. 1, p. 76, 20 ago. 2016.
- BELCHER, J. D. et al. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, n. 7, p. 2451–2459, out. 2000.
- BELISÁRIO, A. R. et al. Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 2, p. 166–181, 2018.
- BOZZI, A. et al. Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p. 212–217, dez. 2009.
- BUCHS, N. et al. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. **Genes And Immunity**, v. 2, p. 222, 6 jul. 2001.
- CERQUEIRA, B. A. V et al. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 471–476, nov. 2011.
- EMBURY, S. H. et al. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 73, n. 1, p. 116–123, jan. 1984.
- GARCIA-GONZALEZ, M. A. et al. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. **Clinical and experimental immunology**, v. 125, n. 3, p. 368–375, set. 2001.
- GUARDA, C. C. DA et al. Heme-mediated cell activation: the inflammatory puzzle of sickle cell anemia. **Expert review of hematology**, v. 10, n. 6, p. 533–541, jun. 2017.
- HOPPE, C. et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**, v. 38, n. 8, p. 2241–2246, ago. 2007.
- HUIZINGA, T. W. et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **Journal of neuroimmunology**, v. 72, n. 2, p. 149–153, fev. 1997.
- HUSSEIN, Y. M. et al. Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 849–855, mar. 2013.

- ILESANMI, O. O. Pathological basis of symptoms and crises in sickle cell disorder: implications for counseling and psychotherapy. **Hematology reports**, v. 2, n. 1, p. e2–e2, 26 jan. 2010.
- KARAHAN, Z. C. et al. TNF-alpha -308G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. **Thrombosis research**, v. 115, n. 5, p. 393–398, 2005.
- KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, mar. 2017.
- KEIKHAEI, B. et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **European cytokine network**, v. 24, n. 1, p. 45–52, mar. 2013.
- KUBOTA, T. et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. Vesnarinone Survival Trial. **Circulation**, v. 97, n. 25, p. 2499–2501, jun. 1998.
- LOGGETTO, S. R. Sickle cell anemia: clinical diversity and beta S-globin haplotypes. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 3, p. 155–157, 2013.
- MAKIS, A. C.; HATZIMICHAEL, E. C.; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **Annals of hematology**, v. 79, n. 8, p. 407–413, ago. 2000.
- MATTHEW, A. et al. Effects of the sickle cell (S) gene on serum protein profile. **Continental J Biomed Sci**, v. 6, p. 1–5, 10 jul. 2012.
- OZGUNES, N. et al. Structural modification of plasma albumin in sickle cell anemia. **Acta haematologica**, v. 133, n. 1, p. 67–69, 2015.
- PANDEY, S. et al. Biochemical indicator of sickle cell disease: preliminary report from India. **Indian journal of clinical biochemistry : IJCB**, v. 27, n. 2, p. 191–195, abr. 2012.
- PATHARE, A. et al. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **American Journal of Hematology**, v. 77, n. 4, p. 323–328, 1 dez. 2004.
- PAWLIK, A. et al. The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, v. 26, n. 1, p. 48–51, nov. 2005.
- PRAVICA, V. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Human immunology**, v. 61, n. 9, p. 863–866, set. 2000.
- QUINN, C. T. et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **American journal of hematology**, v. 91, n. 12, p. 1195–1201, dez. 2016.
- RAFFIELD, L. M. et al. Common α -globin variants modify hematologic and other clinical phenotypes in sickle cell trait and disease. **PLoS genetics**, v. 14, n. 3, p. e1007293, 2018.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, dez. 2010.
- TINDALL, E. A. et al. Comprehensive analysis of the cytokine-rich chromosome 5q31.1 region suggests a role for IL-4 gene variants in prostate cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 10, p. 1748–1754, 19 abr. 2010.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Association of hematological and biochemical data with occurrence of stroke in SCA children. Children with previous history of stroke exhibited: A) increased reticulocytes count (*p*-value obtained using Mann Whitney), B) decreased total proteins levels (*p*-value obtained using t test), C) albumin levels (*p*-value obtained using t test) and D) uric acid levels (*p*-value obtained using t test).

Figure 2. Associations between hematological and biochemical parameters as well as cytokines levels and the presence of -590 C>T polymorphism in *IL4* gene in patients with SCA. SCA children carriers of the CT/TT genotype exhibited A) increased lymphocytes and B) platelets counts, in addition to C) increased plateletcrit. These patients also exhibited D) increased direct bilirubin, E) IL-1 β , F) IL-8 and G) IL-12 levels. *p*-value obtained using Mann-Whitney U test.

Figure 3. Associations between hematological and biochemical parameters and the presence of -590 C>T polymorphism in *IL4* gene in SCA patients with previous history of stroke. SCA children with previous history of stroke carriers of the CT/TT genotype presented A) decreased MCV and B) MCH levels, as well as C) increased RDW levels. Moreover, these patients also exhibited D) increased LDL-C, E) AST, F) total bilirubin and G) indirect bilirubin levels. *p*-value obtained using Mann-Whitney U test.

Table 1. Baseline characteristics of SCA patients, including hematological and biochemical data.

	Stroke group		Control group	
	N	Mean±SD	N	Mean±SD
Gender				
Female	14		17	
Male	10		25	
Age (Years)	24	13.29 ± 4.5	42	14.64 ± 3.7
Laboratory parameters				
Hematologic				
RBC, x10 ⁶ /L	24	2.84 ± 0.52	42	3.02 ± 0.85
Hemoglobin, g/dL	24	9.04 ± 1.26	42	9.11 ± 1.80
Hematocrit, %	24	26.35 ± 3.89	42	26.94 ± 5.60
MCV, fL	24	93.74 ± 11.35	42	90.81 ± 10.47
MCH, µg	24	32.03 ± 4.26	42	30.79 ± 3.49
MCHC, g/dL	24	34.14 ± 1.51	42	33.92 ± 1.04
RDW (%)	24	20.9 ± 3.17	42	21.60 ± 4.48
Reticulocyte Count (%)	24	6.48 ± 2.79	42	4.37 ± 2.12
Total bilirubin, mg/dL	24	2.49 ± 1.92	42	2.89 ± 1.77
Direct bilirubin, mg/dL	24	0.40 ± 0.18	42	0.4 ± 0.17
Indirect bilirubin, mg/dL	24	2.09 ± 1.84	42	2.49 ± 1.72
LDH, U/L	24	1158.04 ± 519.04	42	1042.14 ± 441.04
Leukocytes				
WBC (/mL)	24	12054.58 ± 3567.43	42	10716.66 ± 3250.58
Neutrophil (/mL)	24	6198.29 ± 2444.98	42	5308.09 ± 2403.72
Eosinophil (/mL)	24	371.33 ± 309.17	42	417 ± 339.74
Lymphocyte (/mL)	24	4278.75 ± 1611.37	42	3856.92 ± 1694.02
Monocyte (/mL)	24	1020.16 ± 493.18	42	1007.83 ± 476.06
Platelets				
Platelet count, x10 ³ /mL	24	392.83 ± 133.80	42	399.16 ± 152.02
Mean platelet volume, fL	24	7.7 ± 1.25	42	7.92 ± 0.85
PCT (%)	24	0.30 ± 0.11	42	0.31 ± 0.13
Glucose				
Glucose, mg/dL	24	80.00 ± 7.96	42	83.07 ± 7.91
Lipid metabolism				
Total Cholesterol, mg/dL	24	135.82 ± 41.31	42	124,26 ± 25.83
Triglycerides, mg/dL	24	129.04 ± 98.19	42	109.23 ± 35.26
HDL-C, mg/dL	24	33.82 ± 12.28	42	37.04 ± 8.48
LDL-C, mg/dL	24	71.70 ± 20.80	42	63. 19 ± 22.04
VLDL-C, mg/dL	24	22.56 ± 12.25	42	23.66 ± 10.9
Liver				
ALT, U/L	24	21.47 ± 17.73	42	19,57 ± 14.19
AST, U/L	24	43.95 ± 20.10	42	42.78 ± 18.54
Total protein, g/dL	24	8.0 ± 0.88	42	8.62 ± 0.87
Albumin, g/dL	24	4.51 ± 0.511	42	4.91 ± 0.32

Globulin, g/dL	24	3.48 ± 0.66	42	3.71 ± 0.78
Kidney				
Urea nitrogen, mg/dL	24	20.35 ± 8.14	42	17.48 ± 7.50
Creatinine, mg/dL	24	0.46 ± 0.15	42	0.51 ± 0.19
Inflammation				
IL-8, pg/mL	24	5.16 ± 3.22	42	4.06 ± 2.55
IL-1 β , pg/mL	24	10.00 ± 4.34	42	8.38 ± 5.49
IL-6, pg/mL	24	14.69 ± 1.99	42	14.31 ± 3.46
IL-10, pg/mL	24	12.18 ± 1.20	42	12.21 ± 2.94
TNF, pg/mL	24	3.30 ± 1.47	42	3.45 ± 1.95
IL-12, pg/mL	24	8.04 ± 3.71	42	10.40 ± 15.64

RBC: red blood cells; MCV: mean cell volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW: red cell distribution width; LDH: lactate dehydrogenase; WBC: white blood cell; MPV: mean platelet volume; PCT: plateletcrit; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol; AST: aspartate amino-transferase; ALT: alanine amino-transferase; IL-8: interleukin-8; IL-1 β : interleukin-1 beta; IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; IL12: interleukin-12, TNF: tumor necrosis factor.

Table 2. Frequencies of polymorphisms among case and control group.

Polymorphism	Genotype	Frequencies	
		Stroke group (%)	Control group (%)
<i>TNF</i> -308 G>A	GG	65.00 (13/20)	88.10 (37/42)
	GA	30.00 (6/20)	11.90 (5/42)
	AA	5.00 (1/20)	0 (0/42)
<i>IL1B</i> +3954 C>T	CC	83.30 (15/18)	78.90 (30/38)
	CT	16.70 (3/18)	21.10 (8/38)
	TT	0 (0/18)	0 (0/38)
<i>IFNG</i> +874 T>A	TT	5.00 (1/20)	40.47 (17/42)
	TA	40.00 (8/20)	11.90 (5/42)
	AA	55.00 (12/20)	47.6 (20/42)
<i>IL4</i> -590 C>T	CC	15.00 (3/20)	25.00 (10/40)
	CT	60.00 (12/20)	62.50 (25/40)
	TT	25.00 (5/20)	12.50 (5/40)

Table 3. Multivariable model associating polymorphisms in cytokine genes and hydroxyurea with stroke.

Variables	B	S.E.	Wald	P value	OR	95% C.I.		R Square	P model
						Lower	Upper		
Model 1									
Hydroxyurea	0.341	0.647	0.278	0.598	1.407	0.396	4.999		
<i>IL1B</i> +3954 C>T	- 0.055	0.839	0.004	0.948	0.946	0.183	4.899	0.486	0.012
<i>TNF</i> +308 G>A	1.578	0.738	4.576	0.032	4.847	1.141	20.580		
<i>IFNG</i> +874 T>A	1.612	1.254	1.652	0.199	5.015	0.429	58.616		
<i>IL4</i> -590 C>T	1.224	0.939	1.700	0.192	3.402	0.540	21.435		

B: beta coefficient; S.E.: standard error; OR: Odds Ratio; C.I.: confidence interval.

Figure 1

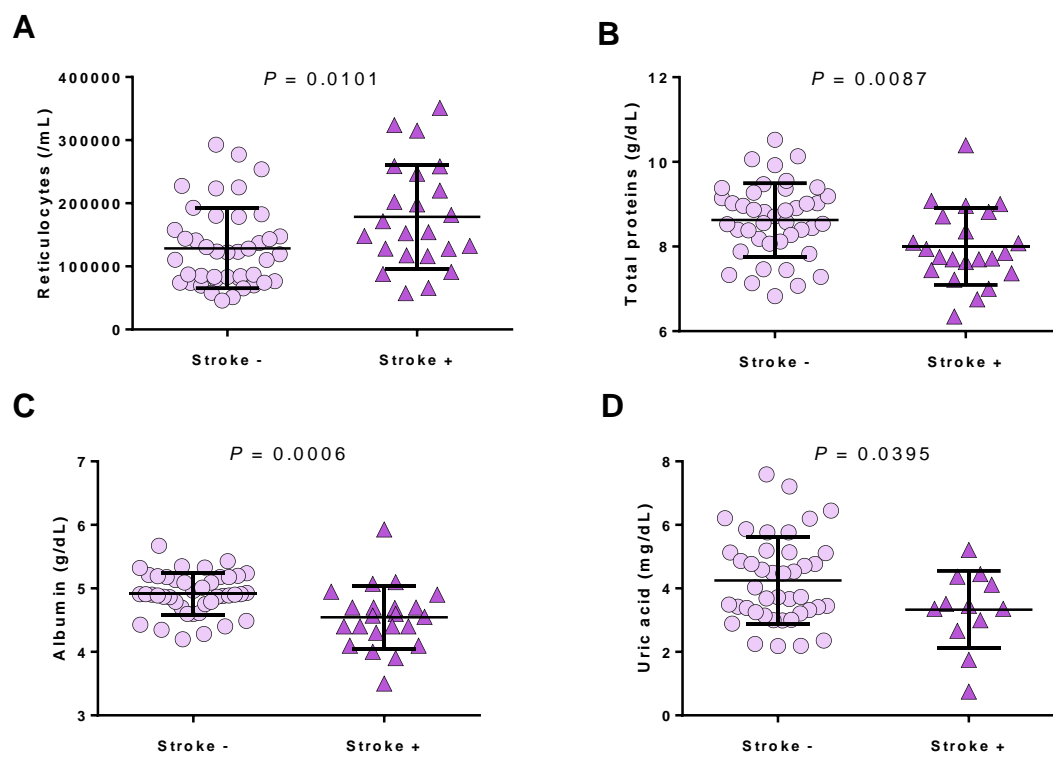


Figure 2

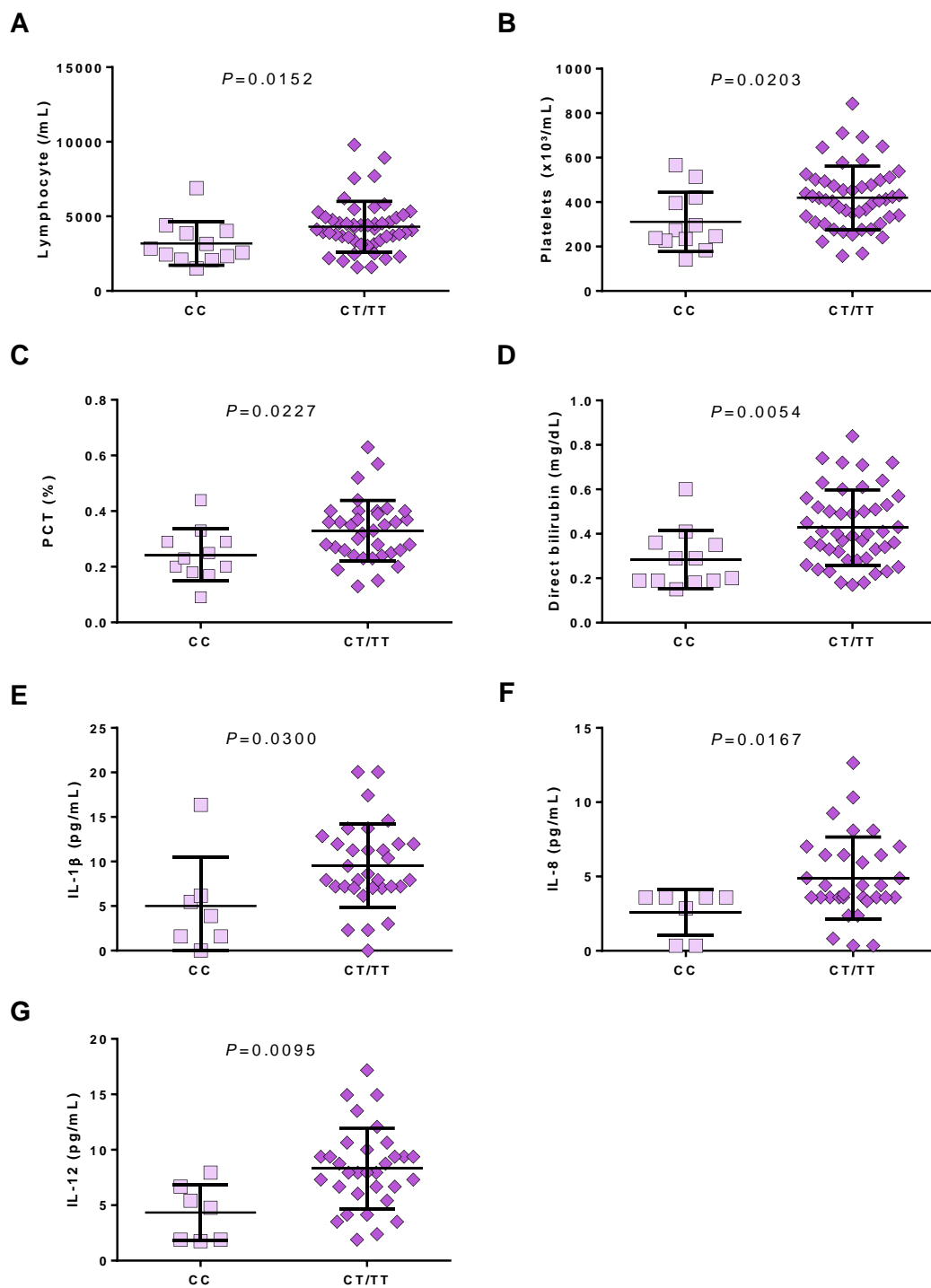
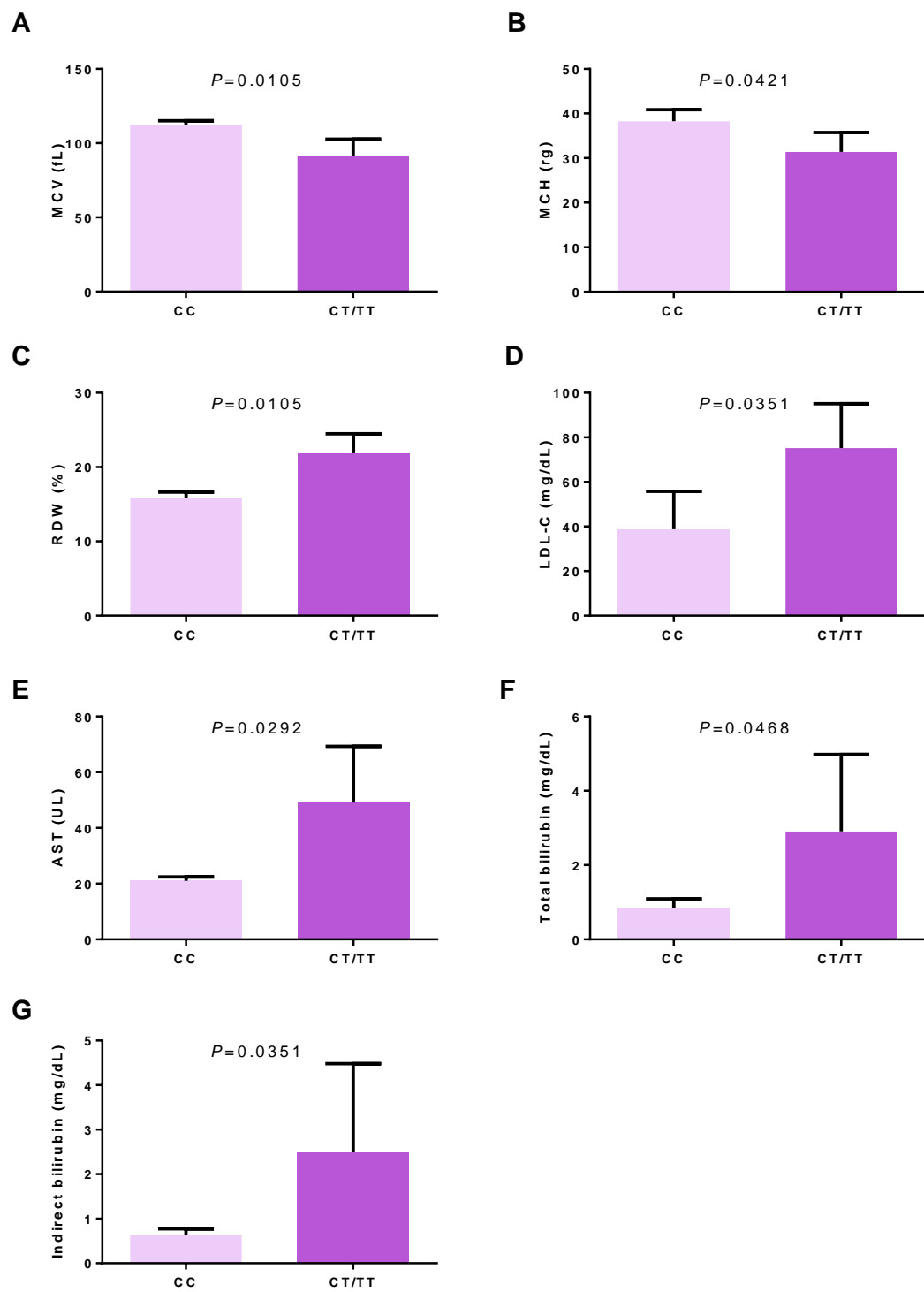


Figure 3



5 DISCUSSÃO

O AVC é uma manifestação clínica grave, de consequências debilitantes, comum em indivíduos com AF. As bases fisiopatológicas para a ocorrência do AVC na AF ainda permanecem pouco elucidadas, porém, acredita-se estar associada a uma condição multifatorial (SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011; SWITZER et al., 2006). No contexto da AF, o AVC está associado à inflamação crônica, à hemólise e à anemia. Diversos marcadores laboratoriais têm sido investigados para identificar possíveis riscos de ocorrência do AVC em indivíduos com AF e estudos clássicos apontam para relação entre a contagem elevada de reticulócitos e eventos de obstrução vascular cerebral (ADAMS et al., 1994a; BERNAUDIN et al., 2011; PAVLAKIS et al., 2010; SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011).

No presente estudo, foi encontrada uma contagem elevada de reticulócitos em crianças com história prévia de AVC, mostrando associação significativa com a ocorrência do AVC. A relação entre a contagem de reticulócitos e a ocorrência do AVC na AF é descrita na literatura e vem sendo confirmada por estudos recentes (ADAMS et al., 1994a, 1997; PAVLAKIS et al., 2010; BERNAUDIN et al., 2011; SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011). Estudos recentes apontaram para a contagem elevada de reticulócitos como o marcador laboratorial mais importante associado ao risco da ocorrência do AVC (BERNAUDIN et al., 2011; SILVA; GIOVANI; VIANA, 2011; MEIER; WRIGHT; MILLER, 2014; BELISARIO et al., 2016;). Sabe-se que a transfusão de hemocomponentes, protocolo de terapia atualmente é utilizado para reduzir as chances de ocorrência do AVC, reduz a hemólise e, conseqüentemente, diminui a chance de obstrução dos vasos sanguíneos (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; LEZCANO et al., 2006), fato que evidencia o papel do fenômeno hemolítico nos processos vaso-oclusivos. No presente estudo, a elevada contagem elevada de reticulócitos sugere que indivíduos que já experimentaram episódios de AVC apresentavam o quadro hemolítico mais exacerbado, o que contribuiu para a ocorrência dos processos inflamatórios crônicos e para o desencadeamento da vaso-oclusão.

Em indivíduos com AF é sabe-se que a polimerização da HbS leva à ocorrência da hemólise e da vaso-oclusão, contribuindo para o desenvolvimento do quadro inflamatório crônico. A hemólise crônica possui implicações patológicas importantes, pois a hemólise intravascular libera hemoglobina e arginase, provocando a depleção dos níveis plasmáticos de NO, contribuindo para a vaso-oclusão e para o estado inflamatório crônico (BELISARIO et al., 2016; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). No contexto vaso-oclusivo, o NO é uma importante molécula vaso-dilatadora, e a redução dos níveis plasmáticos desse gás provoca alterações vasculares, contribuindo para o estreitamento do vaso e, conseqüentemente, para a ocorrência do fenômeno vaso-oclusivo. Estudos epidemiológicos anteriores comprovaram que a hemólise intravascular possui papel importante na disfunção endotelial, onde ficou evidenciado que existe relação entre marcadores laboratoriais de hemólise e o risco de desenvolvimento de manifestações clínicas, como hipertensão pulmonar (GLADWIN et al., 2004), úlcera de perna (GRAMAGLIA et al., 2006; KATO et al., 2006), priapismo (BALDWIN et al., 2005) e AVC (BERNAUDIN et al., 2008). Da mesma forma, a redução do calibre vascular, causado pela depleção de NO, aumenta a ocorrência de dano ao endotélio, contribuindo para o aumento do processo inflamatório (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Além disso, a hemólise intravascular implica no aumento da contagem de reticulócitos, em resposta à morte precoce dos eritrócitos, resultando na reticulocitose, característica na AF.

Os reticulócitos são precursores dos eritrócitos que possuem maior capacidade de aderência ao endotélio vascular, pois possuem em sua membrana a expressão elevada de moléculas de adesão, fato que contribui para o desencadeamento de crises vaso-oclusivas (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). A capacidade de aderência ao endotélio vascular, descrita para os reticulócitos, tem sido considerada como ligação entre a hemólise e a vaso-oclusão na AF e explica fenômenos inflamatórios característicos da doença, pois a adesão de reticulócitos ao endotélio vascular estimula processos inflamatórios (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Na fisiopatologia da AF, a relação entre hemólise e AVC ainda não está bem estabelecida, porém estudos apontam para a relação entre o fenômeno hemolítico e o risco de AVC em crianças com AF (BELISÁRIO et al., 2018; CONNES; VERLHAC; BERNAUDIN, 2013).

Foi encontrada uma associação entre a ocorrência do AVC e a dosagem de ácido úrico. Os níveis de ácido úrico já foram associados com as vias de inflamação em indivíduos com AF

(CERQUEIRA et al., 2011). Sabe-se que o ácido úrico é um DAMP, que se cristaliza ao ser liberado em processos de isquemia e de lesão celular, sendo capaz de ativar as vias do inflamassoma (BRAGA et al., 2017). Além disso, os resultados apontam que crianças com histórico prévio de AVC tiveram dosagem reduzida de albumina e proteínas totais. Estudos prévios mostraram o aumento nos níveis de proteínas totais e de globulinas em indivíduos com AF quando comparados ao grupo controle. A hiperproteinemia é resultado da hiperglobulinemia, a qual ocorre em indivíduos com AF devido ao rompimento do eritrócito em condições patológicas (MATTHEW et al., 2012).

As respostas inflamatórias estão associadas a diversas complicações clínicas na AF, como a esplenomegalia, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, úlcera de perna, neuropatia e AVC (CONRAN; BELCHER, 2018). No contexto da AF, os processos inflamatórios podem estar associados a diversos mecanismos patológicos, tais como a liberação de micropartículas pelos eritrócitos (AWOJODU et al., 2014; CONRAN; BELCHER, 2018), à hemólise intravascular (CONRAN; BELCHER, 2018; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017), à depleção de NO (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017) e à ativação plaquetária (CONRAN; BELCHER, 2018). No contexto inflamatório, durante a hemólise intravascular, ocorre a liberação de moléculas que estimulam vias inflamatórias, como DAMPs e o heme, liberados após a oxidação da hemoglobina (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Em função da disfunção endotelial, moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas recrutam leucócitos para os sítios de lesão, provocando a obstrução vascular e, conseqüentemente, isquemia (FRENETTE, 2004; OKPALA, 2006). Assim, o processo vaso-oclusivo, que desencadeia a obstrução vascular no AVC, pode estar associado à expressão de moléculas inflamatórias, pois tais mediadores, que podem apresentar resposta exacerbada ao dano endotelial, contribuindo para a formação de agregados celulares que irão obstruir o fluxo sanguíneo cerebral (BELISÁRIO et al., 2018). As alterações no perfil inflamatório têm sido amplamente investigadas no contexto do AVC isquêmico, sendo que estudos apontam para a inflamação como fenômeno associado a causa e exacerbção do AVC (GUEDES et al., 2016; J.; J., 2003; MUIR et al., 2007).

Em outras condições inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide, estudos sugerem que a inflamação sistêmica é um fator que contribui significativamente para o desenvolvimento do AVC (EMSLEY; TYRRELL, 2002; MARADIT-KREMERS et al., 2005; SOLOMON et al.,

2006). Autores apontam que pacientes com artrite reumatoide tratados com terapia anti-TNF possuem risco reduzido para desenvolver o AVC, evidenciando o papel dos processos inflamatórios associados à obstrução vascular. Sabe-se que os níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias variam entre indivíduos e que tais variações podem ser influenciadas por fatores genéticos e ambientais.

As alterações genéticas podem ter implicações estruturais ou alterar os níveis de expressão das citocinas e pode influenciar na resposta inflamatória em condições patológicas (SMITH; HUMPHRIES, 2009). No contexto da AF, estudos demonstraram que genes específicos podem estar associados ao desenvolvimento do AVC, como genes relacionados à trombose, à inflamação e à adesão celular (HOPPE et al., 2004; SEBASTIANI et al., 2005; VOETSCH et al., 2007). No presente trabalho foi encontrada associação significativa entre a presença do alelo A no gene do *TNF* e a ocorrência do AVC. Hoppe e colaboradores (2001) demonstraram que o polimorfismo -308 G>A está associado ao risco de AVC em crianças com AF. Devido ao caráter multifatorial do AVC, investigou-se através de análise multivariada as possíveis variáveis que interferem na ocorrência desta manifestação clínica. O resultado mostrou que o polimorfismo no gene do *TNF* está associado à ocorrência do AVC na população estudada. Na literatura, a associação do polimorfismo com o AVC aponta para resultados divergentes. Estudos apontaram para a associação da presença do alelo A no gene no *TNF* e a ocorrência do AVC (BELISARIO et al., 2015, 2016; RUBATTU et al., 2005). Em pacientes italianos, a presença do alelo A esteve associado ao risco elevado para o desenvolvimento de AVC isquêmico (RUBATTU et al., 2005). Estudos realizados em indivíduos afro-americanos e em pacientes coreanos mostrou uma associação do SNP ao AVC, onde o alelo A esteve foi associado ao efeito protetor (HOPPE et al., 2001, 2007; UM; KIM, 2004). Tais divergências evidenciam a necessidade de se avaliar o efeito do SNP em diferentes populações, pois outras variáveis genéticas, principalmente quando associadas a heranças étnicas, podem interferir na expressão gênica. No presente trabalho, não foi encontrada significância estatística referente a ocorrência do polimorfismo e o aumento nos níveis de expressão da molécula. Embora o SNP no gene *TNF* seja um dos mais estudado, dados referentes ao efeito do polimorfismo -308G>A na expressão do gene ainda permanecem inconclusivos. Estudos sugerem que o alelo A é um sítio forte de ativação transcricional, aumentando, portanto, a expressão gênica (AL-KHOLY et al., 2016; KROEGER; CARVILLE;

ABRAHAM, 1997), enquanto outros trabalhos não encontraram associação entre a presença do SNP e alterações plasmáticas da citocina (HUIZINGA et al., 1997; KUBOTA et al., 1998).

No presente estudo, foi encontrada a frequência aumentada do alelo mutante no gene *IFNG*. O resultado encontrado está de acordo com a literatura, onde estudos prévios mostraram que o alelo mutante A é mais frequente que o alelo selvagem T em outras populações (ALBUQUERQUE et al., 2009; EL-BENDARY et al., 2017; GATLIN et al., 2009; GHASEMIAN; SHAHBAZI, 2016; PAVLAKIS et al., 2010). Não foi encontrada significância estatística na associação entre a presença do SNP no *IFNG* e a ocorrência do AVC na população estudada. O efeito do SNP *IFNG* +874 T>A na expressão gênica é controverso. Dados da literatura sugerem o efeito funcional para o polimorfismo, indicando a expressão elevada do genótipo TT, uma expressão média no genótipo TA e baixos níveis expressos no genótipo AA (AL-MOHAYA et al., 2016; PRAVICA et al., 2000). Lee e Bae (2016) apontaram para a associação do SNP ao desenvolvimento de doenças autoimunes, porém, outros autores não confirmaram esta associação. As divergências descritas na literatura podem ser explicadas pela presença de outras variáveis genéticas que podem causar interferência na expressão gênica. O SNP no gene *IFNG* +874 T>A teve frequências diversas em diferentes populações, indicando que pode haver a influência de efeitos étnicos na frequência polimórfica (AL-MOHAYA et al., 2016).

Analisando a presença do SNP no gene da *IL4*, foi encontrada uma associação com parâmetros laboratoriais, tais como contagem de linfócitos e plaquetas bem como concentrações de proteínas totais e bilirrubina direta. Além disso, foram descritos níveis mais elevados de citocinas inflamatórias IL-12, IL-1 β e IL-8 em indivíduos portadores do alelo T, sugerindo que a presença do SNP pode estar associada ao aumento do estado pro-inflamatório. A IL-4 atua em diversas funções biológicas e tem seu papel bem descrito na diferenciação de células do tipo Th2, com influência nas respostas do hospedeiro a infecções parasitárias e reações alérgicas (CHIES; NARDI, 2001; ZAMORANO; RIVAS; PÉREZ-G, 2003). A IL-4 pode apresentar o efeito anti-inflamatório, com redução da expressão de moléculas pró-inflamatórias (WEI et al., 2017).

O resultado da associação encontrada sugere que a presença do alelo T pode estar associada à redução nos níveis de expressão da citocina. Na fisiopatologia da AF, estudos apontaram para níveis mais elevados de citocinas do perfil Th2 em indivíduos em estado estável, mas o efeito exato dessas citocinas na melhoria da condição patológica ainda permanece desconhecido (PATHARE et al., 2004; RAGHUPATHY et al., 2000). No presente estudo,

analisando o grupo de indivíduos que já teve AVC, foi encontrada a associação entre a presença do alelo T e marcadores laboratoriais, tais como volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média, com os valores mais elevados associados aos indivíduos portadores do alelo C. Observou-se a associação entre os valores de RDW, LDL, AST, bilirrubina total e bilirrubina indireta, com valores mais elevados em pacientes portadores do alelo T. Dados da literatura descrevem que em indivíduos com artrite reumatoide, a presença do alelo T foi mais frequente nos indivíduos com a forma ativa da doença (PAWLIK et al., 2005), sugerindo que o SNP pode contribuir para o estado pró-inflamatório. Um estudo prévio mostrou frequência elevada do alelo T no grupo de indivíduos que tiveram AVC, porém não foi observada significância estatística (WEI et al., 2017).

Estudos futuros serão necessários para esclarecer o efeito do alelo T na expressão gênica na população avaliada. Em indivíduos com artrite reumatoide, o genótipo TT foi associado a redução dos níveis plasmáticos de IL-4 (BOZZI et al., 2009; HUSSEIN et al., 2013; TINDALL et al., 2010). Outros estudos, no entanto, descreveram níveis mais elevados da citocina associados à presença do alelo T (PARK et al., 2011; TANGTEERAWATANA et al., 2007).

Deve-se considerar que alguns SNPs investigados no presente estudo, como *IFNG* +874 T>A e *IL1B* +3954 C>T são intrônicos e não interferem na sequência final de aminoácidos. Tais mutações podem influenciar a expressão por outros mecanismos, como interferir no *splicing* do pré-mRNA ou alterar a estabilidade do mRNA, alterando os níveis de transcrição gênica. Genes de citocinas e seus receptores são regiões altamente conservadas, em termos de sequência de éxon (HOLLEGAARD; BIDWELL, 2006). Regiões de íntron, por outro lado, são sítios com taxas elevadas de mutações, tornando tais sequências importantes alvos para o estudo genômico (BRUMFIELD et al., 2003; LOMELIN; JORGENSEN; RISCH, 2010). SNPs em íntrons têm sido associados na literatura a diversas patologias, como câncer de mama, diabetes, artrite reumatoide e lupus eritematoso (EASTON et al., 2007; SCOTT et al., 2007). Polimorfismos em sequências regulatórias de íntrons podem alterar os sítios de ligação de fatores de transcrição, alterando a expressão do gene. Assim, os mecanismos pelos quais os SNPs em íntrons interferem em determinadas patologias podem ser difíceis de ser elucidados, uma vez que tais mutações não interferem diretamente na sequência de aminoácidos. Além disso, tais SNPs podem estar ligados a polimorfismos adjacentes, que de fato causam alterações na expressão gênica e afetam funções metabólicas (COOPER, 2010; FLANAGAN et al., 2011).

Desequilíbrio de ligação (DL) é o termo utilizado na genética de populações para definir o fenômeno da associação não-aleatória de alelos em diferentes loci (SLATKIN, 2008). Esta associação foi primeiramente descrita por Lewontin e Kojima, em 1960, e vem sendo utilizada para análises de evolução genômica, por fornecer evidências sobre o passado, podendo esclarecer mecanismos de seleção artificial e seleção natural (SLATKIN, 2008). O gene *TNF*, por exemplo, é conhecido por estar em forte desequilíbrio de ligação com o locus HLA (do inglês *human leukocyte antigen*) (FLETCHER et al., 2011; HAJEER; HUTCHINSON, 2001; HOPPE et al., 2004). Assim, a associação deste polimorfismo com o AVC pode refletir a presença de alelos de risco no locus do gene do HLA (HOPPE et al., 2001, 2004). No gene *IL1B*, o efeito do polimorfismo +3954 C>T na expressão da citocina ainda não foi completamente elucidado, porém dados sugerem que esse SNP pode estar atuando como marcador funcional de outra mutação, como o SNP -31 T>C, a qual, de fato teria efeitos significativos na expressão da molécula (SMITH; HUMPHRIES, 2009). Assim, a análise do polimorfismo associado a SNPs adjacentes pode oferecer resultados mais conclusivos à cerca da interferência de tais mutações na expressão gênica. No gene *IL4*, estudos anteriores mostraram que o efeito do SNP -590 C>T pode ser mascarado pela presença de outros fatores de risco presentes na região 5q31-33, estando em DL (QIU et al., 2015). Além disso, deve-se analisar que as moléculas inflamatórias que podem contribuir para a ocorrência do AVC atuam de forma sinérgica, portanto, o efeito individual do polimorfismo pode ser moderado.

Devido ao número limitado de indivíduos, os resultados obtidos no presente estudo possuem efeito preliminar e investigações futuras envolvendo número amostral maior devem ser realizadas a fim de se confirmar tais achados. A investigação de fatores genéticos de risco pode ser complementada com outros fatores de risco, como as velocidades das artérias cerebrais que são medidas pelo doppler transcraniano; no entanto, as associações relevantes descritas no presente estudo serão úteis para orientar novos achados associados aos pacientes com AF e AVC. A avaliação de múltiplos fatores para identificação precoce do risco de AVC em crianças com AF pode ser mais eficaz e levar a intervenções apropriadas para a prevenção do AVC.

6 CONCLUSÕES

- Em indivíduos com HbSS com histórico prévio de AVC existem alterações nos parâmetros laboratoriais, tais como a contagem de reticulócitos, a dosagem de proteínas totais, albumina e ácido úrico;
- O polimorfismo -308 G>A no gene *TNF* esteve associado à ocorrência do AVC, sugerindo que este pode vir a ser utilizado como preditor do AVC nos indivíduos HbSS;
- A presença dos SNPs nos genes *IFNG* +874 T>A e *IL-1B* +3954 C>T não esteve associada à ocorrência do AVC;
- O alelo variante do polimorfismo *IFNG* +874 T>A foi mais frequente que o alelo selvagem, mostrando que a população estudada apresenta frequência alélica atípica;
- O polimorfismo no gene *IL4* esteve associado a alterações em parâmetros laboratoriais, como os valores de RDW, LDL, AST, bilirrubina total e bilirrubina indireta. A presença do alelo T esteve associada a níveis elevados de citocinas, como IL-8, IL-1 β e IL-12, indicando que a presença da mutação pode estar contribuindo para o aumento do estado pró-inflamatório. Mais estudos são necessários para se elucidar os mecanismos que explicam tais associações.

7 REFERÊNCIAS

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V *et al.* Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **NATURE IMMUNOLOGY**, v. 8, n. 9, p. 942–949, set. 2007.

ADAMS, H. P. J. *et al.* Guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. **CIRCULATION**, v. 90, n. 3, p. 1588–1601, set. 1994a.

ADAMS, R. J. *et al.* Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY**, v. 45, n. 4, p. 279–282, abr. 1994b.

ADAMS, R. J. *et al.* Long-term stroke risk in children with sickle cell disease screened with transcranial doppler. **ANNALS OF NEUROLOGY**, v. 42, n. 5, p. 699–704, 1 nov. 1997.

ADAMS, R. J. TCD in sickle cell disease: an important and useful test. **PEDIATRIC RADIOLOGY**, v. 35, n. 3, p. 229–234, mar. 2005.

ADAMS, R. J. Big strokes in small persons. **ARCHIVES OF NEUROLOGY**, v. 64, n. 11, p. 1567–1574, nov. 2007.

AL-KHOLY, W. *et al.* TNF- α -308 G>A and IFN- γ +874 A>T gene polymorphisms in Egyptian patients with lupus erythematosus. **META GENE**, v. 9, p. 137–141, 2016.

AL-MOHAYA, M. A. M. *et al.* Association of genetic polymorphisms in interferon- γ , interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 gene with oral lichen planus susceptibility. **BMC ORAL HEALTH**, v. 16, n. 1, p. 76, 20 ago. 2016.

ALBUQUERQUE, M. C. DE *et al.* The IFN- γ +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. **MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, 2009.

ASARE, K. *et al.* Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. **CYTOKINE**, v. 49, n. 1, p. 39–44, jan. 2010.

ATAGA, K. I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias. **HAEMATOLOGICA**, v. 94, n. 11, p. 1481–1484, nov. 2009.

AWOJODU, A. O. *et al.* Acid sphingomyelinase is activated in sickle cell erythrocytes and contributes to inflammatory microparticle generation in SCD. **BLOOD**, v. 124, n. 12, p. 1941–1950, set. 2014.

BALDWIN, C. *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, jul. 2005.

BALLAS, S. K.; LUSARDI, M. Hospital readmission for adult acute sickle cell painful episodes: frequency, etiology, and prognostic significance. **AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY**, v. 79, n. 1, p. 17–25, maio 2005.

BELCHER, J. D. *et al.* Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **BLOOD**, v. 96, n. 7, p. 2451–2459, out. 2000.

BELCHER, J. D. *et al.* Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. **BLOOD**, v. 123, n. 3, p. 377–390, jan. 2014.

BELISARIO, A. R. *et al.* Association of alpha-thalassemia, TNF-alpha (-308G>A) and VCAM-1 (c.1238G>C) gene polymorphisms with cerebrovascular disease in a newborn cohort of 411 children with sickle cell anemia. **BLOOD CELLS, MOLECULES & DISEASES**, v. 54, n. 1, p. 44–50, jan. 2015.

BELISARIO, A. R. *et al.* Reticulocyte count is the most important predictor of acute cerebral ischemia and high-risk transcranial Doppler in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia. **ANNALS OF HEMATOLOGY**, v. 95, n. 11, p. 1869–1880, out. 2016.

BELISÁRIO, A. R. *et al.* Genetic, laboratory and clinical risk factors in the development of overt ischemic stroke in children with sickle cell disease. **HEMATOLOGY, TRANSFUSION AND CELL THERAPY**, v. 40, n. 2, p. 166–181, 2018.

BENSINGER, T. A.; GILLETTE, P. N. Hemolysis in sickle cell disease. **ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE**, v. 133, n. 4, p. 624–631, abr. 1974.

BERNAUDIN, F. *et al.* G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. **BLOOD**, v. 112, n. 10, p. 4314–4317, nov. 2008.

BERNAUDIN, F. *et al.* Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. **BLOOD**, v. 117, n. 4, p. 1130–40; quiz 1436, jan. 2011.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS**, v. 20, n. 2, p. 97–113, abr. 2009.

BOKHARI, F. *et al.* TNF-alpha: a risk factor for ischemic stroke. [s.l.: s.n.]. v. 26
BOZZI, A. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. **CYTOKINE**, v. 48, n. 3, p. 212–217, dez. 2009.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **THE JOURNAL OF PATHOLOGY**, v. 214, n. 2, p. 149–160, jan. 2008.

BRAGA, T. T. *et al.* Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 7, p. 39884, jan. 2017.

BRUMFIELD, R. *et al.* The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **TRENDS ECOLOGY EVOLUTION**, v. 18, p. 249-256. [s.l: s.n.].

BUCHS, N. *et al.* IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. **GENES AND IMMUNITY**, v. 2, p. 222, 6 jul. 2001.

CARDENES, N. *et al.* Platelet bioenergetic screen in sickle cell patients reveals mitochondrial complex V inhibition, which contributes to platelet activation. **BLOOD**, v. 123, n. 18, p. 2864–2872, maio 2014.

CAROLYN, H. *et al.* Confirmation of an Association Between the TNF(–308) Promoter Polymorphism and Stroke Risk in Children With Sickle Cell Anemia. **STROKE**, v. 38, n. 8, p. 2241–2246, 1 ago. 2007.

CARVALHO, M. O. S. *et al.* Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. **BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY**, v. 182, n. 6, p. 933–936, 1 set. 2018.

CERQUEIRA, B. A. V *et al.* Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **CYTOKINE**, v. 56, n. 2, p. 471–476, nov. 2011.

CHANG MILBAUER, L. *et al.* Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. **BLOOD**, v. 111, n. 7, p. 3872–3879, abr. 2008.

CHIES, J. A.; NARDI, N. B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **MEDICAL HYPOTHESES**, v. 57, n. 1, p. 46–50, jul. 2001.

CHUNG, Y. *et al.* Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **IMMUNITY**, v. 30, n. 4, p. 576–587, abr. 2009.

CONNES, P.; VERLHAC, S.; BERNAUDIN, F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. **BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY**, v. 161, n. 4, p. 484–498, maio 2013.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION**, v. 68, n. 2–3, p. 263–299, 2018.

COOPER, D. N. Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes. **HUMAN GENOMICS**, v. 4, n. 5, p. 284–288, 1 jun. 2010.

DHILLON, N.; LIANG, K. Prevention of stroke in rheumatoid arthritis. **CURRENT TREATMENT OPTIONS IN NEUROLOGY**, v. 17, n. 7, p. 356, jul. 2015.

DRISCOLL, M. C. *et al.* Stroke risk in siblings with sickle cell anemia. **BLOOD**, v. 101, n. 6, p.

2401–2404, mar. 2003.

EASTON, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **NATURE**, v. 447, n. 7148, p. 1087–1093, jun. 2007.

EL-BENDARY, M. *et al.* Association of interferon gamma gene polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus infection in Egyptian patients: A multicenter, family-based study. **JGH OPEN**, v. 1, n. 4, p. 140–147, 1 dez. 2017.

EMBURY, S. H. *et al.* Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. **THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION**, v. 73, n. 1, p. 116–123, jan. 1984.

EMSLEY, H. C. A.; TYRRELL, P. J. Inflammation and infection in clinical stroke. **JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM**, v. 22, n. 12, p. 1399–1419, dez. 2002.

FIGUEIREDO, R. T. *et al.* Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, jul. 2007.

FLANAGAN, J. M. *et al.* Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. **BLOOD**, v. 117, n. 24, p. 6681–6684, jun. 2011.

FLETCHER, G. J. *et al.* Association of HLA and TNF polymorphisms with the outcome of HBV infection in the South Indian population. **GENES & IMMUNITY**, v. 12, n. 7, p. 552–558, 2011.

FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY**, v. 9, n. 2, p. 101–106, mar. 2002.

FRENETTE, P. S. Sickle cell vasoocclusion: heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion. **MICROCIRCULATION**, v. 11, n. 2, p. 167–177, mar. 2004.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **NATURE REVIEWS. RHEUMATOLOGY**, v. 6, n. 4, p. 232–241, abr. 2010.

GADANI, S. P. *et al.* IL-4 in the brain: a cytokine to remember. **JOURNAL OF IMMUNOLOGY**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 1 nov. 2012.

GALBRAITH, G. M. *et al.* Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. **JOURNAL OF CLINICAL PERIODONTOLOGY**, v. 26, n. 11, p. 705–709, nov. 1999.

GALIZA NETO, G. C. DE; PITOMBEIRA, M. DA S. Aspectos moleculares da anemia falciforme Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratoria, **SCIELO**, 2003.

GARCIA-GONZALEZ, M. A. *et al.* The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. **CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY**, v.

125, n. 3, p. 368–375, set. 2001.

GATLIN, M. R. *et al.* Association of the gene polymorphisms IFN-gamma +874, IL-13 -1055 and IL-4 -590 with patterns of reinfection with *Schistosoma mansoni*. **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**, v. 3, n. 2, p. e375, 2009.

GHASEMIAN, N.; SHAHBAZI, M. Interferon Gamma Gene Polymorphism (+874 T > A) and Chronic Hepatitis B in the Population of Gorgan, North-Eastern Iran. **JUNDISHAPUR JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, v. 9, n. 8, p. e33639–e33639, 21 ago. 2016.

GHOSH, S. *et al.* Extracellular heme crisis triggers acute chest syndrome in sickle mice. **THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION**, v. 123, n. 11, p. 4809–4820, nov. 2013.

GLADWIN, M. T. *et al.* Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**, v. 350, n. 9, p. 886–895, fev. 2004.

GRAMAGLIA, I. *et al.* Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. **NATURE MEDICINE**, v. 12, n. 12, p. 1417–1422, dez. 2006.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**, v. 10, n. 4, p. e0004669, abr. 2016.

GUARDA, C. C. DA *et al.* Heme-mediated cell activation: the inflammatory puzzle of sickle cell anemia. **Expert review of hematology**, v. 10, n. 6, p. 533–541, jun. 2017.

HABARA, A.; STEINBERG, M. H. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. **EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE**, v. 241, n. 7, p. 689–696, abr. 2016.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. **HUMAN IMMUNOLOGY**, v. 62, n. 11, p. 1191–1199, nov. 2001.

HOLLEGAARD, M. V; BIDWELL, J. L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. **GENES AND IMMUNITY**, v. 7, p. 269, 27 abr. 2006.

HOPPE, C. *et al.* A novel multilocus genotyping assay to identify genetic predictors of stroke in sickle cell anaemia. **BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY**, v. 114, n. 3, p. 718–720, set. 2001.

HOPPE, C. *et al.* Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **BLOOD**, v. 103, n. 6, p. 2391–2396, mar. 2004.

HOPPE, C. *et al.* Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism

and stroke risk in children with sickle cell anemia. **STROKE**, v. 38, n. 8, p. 2241–2246, ago. 2007.

HUIZINGA, T. W. *et al.* TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. **JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY**, v. 72, n. 2, p. 149–153, fev. 1997.

HUSSEIN, Y. M. *et al.* Influence of interleukin-4 gene polymorphisms and interleukin-4 serum level on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population. **CYTOKINE**, v. 61, n. 3, p. 849–855, mar. 2013.

ILESANMI, O. O. Pathological basis of symptoms and crises in sickle cell disorder: implications for counseling and psychotherapy. **HEMATOLOGY REPORTS**, v. 2, n. 1, p. e2–e2, 26 jan. 2010.

J., L. P.; J., G. A. Inflammation and Infections as Risk Factors for Ischemic Stroke. **STROKE**, v. 34, n. 10, p. 2518–2532, 1 out. 2003.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY**, v. 87, n. 5, p. 779–789, 1 maio 2010.

KAN, Y. W.; DOZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, v. 75, n. 11, p. 5631–5635, nov. 1978.

KARAHAN, Z. C. *et al.* TNF-alpha -308G/A and IL-6 -174 G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. **THROMBOSIS RESEARCH**, v. 115, n. 5, p. 393–398, 2005.

KATO, G. J. *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, mar. 2006.

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

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION**, v. 127, n. 3, p. 750–760, mar. 2017.

KEIKHAEI, B. *et al.* Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **EUROPEAN CYTOKINE NETWORK**, v. 24, n. 1, p. 45–52, mar. 2013.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **MOLECULAR IMMUNOLOGY**, v. 34, n. 5, p.

391–399, abr. 1997.

KUBOTA, T. *et al.* Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. VEST Investigators for TNF Genotype Analysis. Vesnarinone Survival Trial. **CIRCULATION**, v. 97, n. 25, p. 2499–2501, jun. 1998.

KWIATKOWSKI, J. L. *et al.* Transcranial Doppler ultrasonography in siblings with sickle cell disease. **BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY**, v. 121, n. 6, p. 932–937, jun. 2003.

LEE, S. H. *et al.* Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 7, n. 1, p. 10133, 2017.

LEE, Y. H.; BAE, S.-C. Association between interferon-gamma +874 T/A polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **LUPUS**, v. 25, n. 7, p. 710–718, jun. 2016.

LEZCANO, N. E. *et al.* Regular transfusion lowers plasma free hemoglobin in children with sickle-cell disease at risk for stroke. **STROKE**, v. 37, n. 6, p. 1424–1426, jun. 2006.

LI, X. *et al.* The effects of gene polymorphisms in interleukin-4 and interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population. **BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL**, v. 2014, p. 265435, 2014.

LIBREGTS, S. F. *et al.* Chronic IFN-gamma production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. **BLOOD**, v. 118, n. 9, p. 2578–2588, set. 2011.

LOMELIN, D.; JORGENSON, E.; RISCH, N. Human genetic variation recognizes functional elements in noncoding sequence. **GENOME RESEARCH**, v. 20, n. 3, p. 311–319, mar. 2010.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. **CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS**, v. 22, n. 4, p. 189–195, ago. 2011.

LOGGETTO, S. R. Sickle cell anemia: clinical diversity and beta S-globin haplotypes. **REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**, v. 35, n. 3, p. 155–157, 2013

MAHMOUD, A. A. *et al.* Association of interferon- γ and its (+874 T/A) gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus in rheumatoid arthritis patients. **THE EGYPTIAN RHEUMATOLOGIST**, v. 38, n. 4, p. 277–282, 2016.

MAKIS, A. C.; HATZIMICHAEL, E. C.; BOURANTAS, K. L. The role of cytokines in sickle cell disease. **ANNALS OF HEMATOLOGY**, v. 79, n. 8, p. 407–413, ago. 2000.

MARADIT-KREMERS, H. *et al.* Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. **ARTHRITIS AND RHEUMATISM**, v. 52, n. 3, p. 722–732, mar. 2005.

MATTHEW, A. *et al.* Effects of the sickle cell (S) gene on serum protein profile. **CONTINENTAL J BIOMED SCI**, v. 6, p. 1–5, 10 jul. 2012.

MEIER, E. R. *et al.* Early Reticulocytosis and Anemia Are Associated with Abnormal and Conditional Transcranial Doppler Velocities in Children With Sickle Cell Anemia. **THE JOURNAL OF PEDIATRICS**, v. 169, p. 227–231.e1, 1 fev. 2016.

MEIER, E. R.; WRIGHT, E. C.; MILLER, J. L. Reticulocytosis and anemia are associated with an increased risk of death and stroke in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. **AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY**, v. 89, n. 9, p. 904–906, set. 2014.

MEYER, O. Interferons and autoimmune disorders. **JOINT, BONE, SPINE : REVUE DU RHUMATISME**, v. 76, n. 5, p. 464–473, out. 2009.

MORENO, O. *et al.* Polymorphisms in the IL4 and IL4RA genes in Colombian patients with rheumatoid arthritis. **THE JOURNAL OF RHEUMATOLOGY**, v. 34, n. 1, p. 36 LP – 42, 1 jan. 2007.

MUIR, K. W. *et al.* Inflammation and ischaemic stroke. **CURRENT OPINION IN NEUROLOGY**, v. 20, n. 3, p. 334–342, jun. 2007.

MUNRO, J. M.; POBER, J. S.; COTRAN, R. S. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. **THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY**, v. 135, n. 1, p. 121–133, jul. 1989.

NATH, K. A.; HEBBEL, R. P. Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. **NATURE REVIEWS. NEPHROLOGY**, v. 11, n. 3, p. 161–171, mar. 2015.

OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY**, v. 13, n. 1, p. 40–44, jan. 2006.

OZGUNES, N. *et al.* Structural modification of plasma albumin in sickle cell anemia. **ACTA HAEMATOLOGICA**, v. 133, n. 1, p. 67–69, 2015.

PALM, F. *et al.* Association between infectious burden, socioeconomic status, and ischemic stroke. **ATHEROSCLEROSIS**, v. 254, p. 117–123, nov. 2016.

PANDEY, S. *et al.* Biochemical indicator of sickle cell disease: preliminary report from India. **INDIAN JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY : IJCB**, v. 27, n. 2, p. 191–195, abr. 2012.

PARK, H. J. *et al.* Association between interleukin-4 gene polymorphisms and intracerebral haemorrhage in Korean population. **INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOGENETICS**, v. 38, n. 4, p. 321–325, ago. 2011.

PARK, H. K. *et al.* Promoter polymorphism (-590, T/C) of interleukin 4 (IL4) gene is associated with rheumatoid arthritis: An updated meta-analysis. **SAUDI JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 24, n. 2, p. 444–449, fev. 2017.

PATHARE, A. *et al.* Cytokines in sickle cell disease. **HEMATOLOGY (AMSTERDAM, NETHERLANDS)**, v. 8, n. 5, p. 329–337, out. 2003.

PATHARE, A. *et al.* Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY**, v. 77, n. 4, p. 323–328, 1 dez. 2004.

PAVLAKIS, S. G. *et al.* Transcranial doppler ultrasonography (TCD) in infants with sickle cell anemia: baseline data from the BABY HUG trial. **PEDIATRIC BLOOD & CANCER**, v. 54, n. 2, p. 256–259, fev. 2010.

PAWLIK, A. *et al.* The -590 IL-4 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL**, v. 26, n. 1, p. 48–51, nov. 2005.

PRAVICA, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **HUMAN IMMUNOLOGY**, v. 61, n. 9, p. 863–866, set. 2000.

QARI, M. H.; DIER, U.; MOUSA, S. A. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. **CLINICAL AND APPLIED THROMBOSIS/HEMOSTASIS**, v. 18, n. 2, p. 195–200, 2012.

QIU, L.-J. *et al.* Relationship between the IL-4 gene promoter -590C/T (rs2243250) polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY**, v. 29, n. 1, p. 48–55, 1 jan. 2015.

QUINN, C. T. *et al.* Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY**, v. 91, n. 12, p. 1195–1201, dez. 2016.

RAFFIELD, L. M. *et al.* Common α -globin variants modify hematologic and other clinical phenotypes in sickle cell trait and disease. **PLOS GENETICS**, v. 14, n. 3, p. e1007293, 2018.

RAGHUPATHY, R. *et al.* Th1 and Th2 Cytokine Profiles in Sickle Cell Disease. **ACTA HAEMATOLOGICA**, v. 103, n. 4, p. 197–202, 2000.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **LANCET (LONDON, ENGLAND)**, v. 376, n. 9757, p. 2018–2031, dez. 2010.

RUBATTU, S. *et al.* A role of TNF-alpha gene variant on juvenile ischemic stroke: a case-control study. **EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY**, v. 12, n. 12, p. 989–993, dez. 2005.

- SANVITO, L. *et al.* The Multifaceted Role of Interferon- γ in Central Nervous System. **AUTOIMMUNE DEMYELINATION**. [s.l: s.n.]. v. 2
- SCHRODER, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY**, v. 75, n. 2, p. 163–189, fev. 2004.
- SCOTT, L. J. *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **SCIENCE**, v. 316, n. 5829, p. 1341–1345, 1 jun. 2007.
- SEBASTIANI, P. *et al.* Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. **NATURE GENETICS**, v. 37, n. 4, p. 435–440, abr. 2005.
- SEBASTIANI, P. *et al.* Genome-Wide Association Study of Stroke in Sickle Cell Anemia. **BLOOD**, v. 114, n. 22, p. 1528 LP – 1528, 20 nov. 2009.
- SIKORA, J. *et al.* Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. **BLOOD**, v. 124, n. 13, p. 2150–2157, set. 2014.
- SILVA, C. M.; GIOVANI, P.; VIANA, M. B. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. **PEDIATRIC BLOOD & CANCER**, v. 56, n. 1, p. 116–121, jan. 2011.
- SLATKIN, M. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **NATURE REVIEWS. GENETICS**, v. 9, n. 6, p. 477–485, jun. 2008.
- SMITH, A. J. P.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS**, v. 20, n. 1, p. 43–59, fev. 2009.
- SOLOMON, D. H. *et al.* Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. **ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES**, v. 65, n. 12, p. 1608–1612, dez. 2006.
- STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY**, v. 87, n. 8, p. 795–803, ago. 2012.
- SWITZER, J. A. *et al.* Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **THE LANCET. NEUROLOGY**, v. 5, n. 6, p. 501–512, jun. 2006.
- SZABO, S. J. *et al.* Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. **ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY**, v. 21, p. 713–758, 2003.
- TANGTEERAWATANA, P. *et al.* Relative levels of IL4 and IFN-gamma in complicated malaria: association with IL4 polymorphism and peripheral parasitemia. **ACTA TROPICA**, v. 101, n. 3, p. 258–265, mar. 2007.
- TINDALL, E. A. *et al.* Comprehensive analysis of the cytokine-rich chromosome 5q31.1 region

suggests a role for IL-4 gene variants in prostate cancer risk . **CARCINOGENESIS**, v. 31, n. 10, p. 1748–1754, 19 abr. 2010.

TONG, Y.-Q. *et al.* Association of variable number of tandem repeat polymorphism in the IL-4 gene with ischemic stroke in the Chinese Uyghur population. **GENET MOL RES**, v. 12, n 15, p. 2423, jul. 2013

UM, J.-Y.; KIM, H.-M. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism is associated with cerebral infarction. **BRAIN RESEARCH. MOLECULAR BRAIN RESEARCH**, v. 122, n. 1, p. 99–102, mar. 2004.

VOETSCH, B. *et al.* Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. **STROKE**, v. 38, n. 1, p. 41–49, jan. 2007.

W NEWELL, D.; AASLID, R. Transcranial Doppler: clinical and experimental uses. **CEREBROVASCULAR BRAIN METABOLISM REVIEW**, v. 4, p. 122-143. [s.l: s.n.].

WAUTIER, J.-L.; WAUTIER, M.-P. Molecular basis of erythrocyte adhesion to endothelial cells in diseases. **CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION**, v. 53, n. 1–2, p. 11–21, 2013.

WEBB, J.; KWIATKOWSKI, J. L. Stroke in patients with sickle cell disease. **EXPERT REVIEW OF HEMATOLOGY**, v. 6, n. 3, p. 301–316, jun. 2013.

WEI, H. *et al.* Association between interleukin-4 genetic polymorphisms and the risk of cerebral infarction in a population of China. **BIOMEDICAL RESEARCH**, v. 28, n. 21, p. 9198–9203, 2017.

WELSH, P. *et al.* Associations of proinflammatory cytokines with the risk of recurrent stroke. **STROKE**, v. 39, n. 8, p. 2226–2230, ago. 2008.

ZAMORANO, J.; RIVAS, M. D.; PÉREZ-G, M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. **INMUNOLOGÍA** v. 22, n, 2, p. 215-224, abr. 2003.

APÊNDICES

A. ARTIGOS PRODUZIDOS EM COLABORAÇÃO

B. TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

C. QUESTIONÁRIO

D. APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA (CEP)

IGOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO



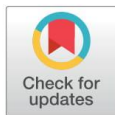
RESEARCH ARTICLE

Hydroxyurea alters hematological, biochemical and inflammatory biomarkers in Brazilian children with SCA: Investigating associations with β^S haplotype and α -thalassemia

Sètondji Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou^{1,2}, Caroline Conceição da Guarda^{1,2}, Camylla Vilas Boas Figueiredo^{1,2}, Rayra Pereira Santiago^{1,2}, Suellen Pinheiro Carvalho^{1,2}, Luciana Magalhães Fiuza^{1,2}, Uche Samuel Ndidj³, Rodrigo Mota Oliveira^{1,2}, Magda Oliveira Seixas Carvalho⁴, Valma Maria Lopes Nascimento⁵, Larissa Carneiro Rocha⁵, Isa Menezes Lyra⁵, Elisângela Vitória Adorno², Marilda Souza Goncalves^{1,2*}

1 Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brasil, **2** Laboratório de Pesquisa em Anemia, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, **3** Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria, **4** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Salvador, Bahia, Brasil, **5** Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

* mari@bahia.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Yahouédéhou SCMA, da Guarda CC, Figueiredo CVB, Santiago RP, Carvalho SP, Fiuza LM, et al. (2019) Hydroxyurea alters hematological, biochemical and inflammatory biomarkers in Brazilian children with SCA: Investigating associations with β^S haplotype and α -thalassemia. PLoS ONE 14(7): e0218040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218040>

Editor: Ana Paula Arez, Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical, PORTUGAL

Received: January 5, 2019

Accepted: May 24, 2019

Published: July 15, 2019

Copyright: © 2019 Yahouédéhou et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the: 1- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (470959/2014-2 and 405595/2016-6 to MSG). <http://www.cnpq.br/> and 2- Coordenação de Aperfeiçoamento de

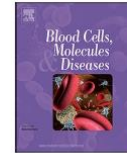
Abstract

This study investigated the effects of hydroxyurea (HU) on hematological, biochemical and inflammatory parameters in children with sickle cell anemia (SCA) in association with β^S haplotype and α -thalassemia. We included 22 children with SCA who were followed for an average of 14.5 months. Laboratory parameters were assessed by electronic methods, and molecular analysis was investigated by PCR-RFLP and allele-specific PCR. Results showed significant increases in hemoglobin, HbF, hematocrit, MCV, MCH, glucose, HDL-C and albumin levels, as well as significant decreases in MCHC and AST levels, WBC, neutrophils, eosinophils, lymphocytes and reticulocytes, in children during HU therapy. HbF levels were positively correlated with hemoglobin, hematocrit, MCV and total protein, yet negatively correlated with MCHC, RDW, AAT and AST during HU therapy ($p < 0.05$). Children who carried the Central African Republic haplotype, in response to HU therapy, presented significant increases in hemoglobin, hematocrit, triglycerides and uric acid levels, as well as significant decreases in MCHC, AST and direct bilirubin levels, WBC, neutrophils, eosinophils, lymphocytes and reticulocytes. Those with the Benin haplotype presented increases in HbF and albumin levels, and a reduction in platelet counts ($p < 0.05$). Children with α -thalassemia presented decreased ALT during HU use, while those without this deletion presented increases in hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, HDL-C and albumin, as well as decreases in MCHC, neutrophils, lymphocytes, reticulocytes and AST ($p < 0.05$). Hence, regardless of its use in association with β^S haplotypes or α -thalassemia, HU seems to be linked to alterations in hemolytic, inflammatory, hepatic, lipid and glycemic profiles.



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

Letter to the Editor

Serum haptoglobin and hemopexin levels are depleted in pediatric sickle cell disease patients

ARTICLE INFO

Editor: Mohandas Narla

To the Editor:

Anemia, hemolysis and vaso-occlusion are the hallmarks of sickle cell disease (SCD). The release of hemoglobin (Hb) and heme into the intravascular milieu can promote inflammatory responses including vasculopathy, leukocyte, platelet and endothelial cell activation, thrombosis, and even renal injury [1]. Nature defends the vasculature from hemoglobin/heme by plasma haptoglobin and hemopexin, which tightly bind free hemoglobin and heme, respectively. Haptoglobin-hemoglobin and hemopexin-heme complexes bind to CD163 and CD91

receptors found primarily on macrophages and hepatocytes respectively, and are taken up by receptor-mediated endocytosis [2]. While it is generally accepted that haptoglobin and hemopexin are depleted in SCD patients [3], we found a limited number of publications that have reported human plasma haptoglobin levels in SCD patients [4–11] and only two papers from 1968 and 1971 that have reported human plasma hemopexin levels in SCD patients, albeit in limited numbers [5, 7]. We found no papers that compared hemopexin levels in SS, SC and AA children. In this letter, we examined serum haptoglobin and hemopexin levels and biomarkers of hemolysis in SS, SC and AA children in Brazil.

Table 1

Association of laboratory parameters in SS and SC patients and AA individuals.

	SS patients N = 179	SC patients N = 93	AA individuals N = 28	p value	Dunn's multiple comparisons test		
	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE		SS vs SC	SS vs AA	SC vs AA
Gender, % female	39.88	54.63	51.72				
Age, years	9.77 ± 0.52	10.70 ± 0.93	8.82 ± 0.66				
Hemolysis markers							
RBC, 10 ⁹ /mL	2.73 ± 0.03	4.34 ± 0.05	4.71 ± 0.34	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.290
Hemoglobin, g/dL	8.46 ± 0.09	11.45 ± 0.10	12.81 ± 0.17	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.029
Reticulocytes, %	7.28 ± 0.17	3.95 ± 0.18	0.84 ± 0.04	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Reticulocytes, 10 ⁹ /mL	19.94 ± 0.56	17.44 ± 0.89	3.97 ± 0.22	< 0.001	0.0122	< 0.001	< 0.001
Total bilirubin, mg/dL	2.30 ± 0.08	1.01 ± 0.05	0.49 ± 0.03	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.006
Indirect bilirubin, mg/dL	1.75 ± 0.07	0.70 ± 0.04	0.25 ± 0.02	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003
LDH, U/L	1231.00 ± 36.70	587.00 ± 20.13	426.30 ± 16.40	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.075
Hemopexin, µg/mL	251.70 ± 17.36	815.70 ± 42.02	2077.00 ± 124.20	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002
Haptoglobin, µg/mL	49.15 ± 3.47	60.14 ± 6.30	493.70 ± 63.30	< 0.001	0.898	< 0.001	< 0.001
Total heme, µM	80.67 ± 4.96	38.06 ± 1.91	46.45 ± 4.11	< 0.001	< 0.001	0.002	0.472
Leukocytes							
WBC, 10 ⁹ /mL	13.00 ± 0.32	8.58 ± 0.28	7.43 ± 0.51	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.436
Platelets							
Platelets, 10 ⁹ /mL	418.6 ± 10.86	274.80 ± 11.42	314.70 ± 13.13	< 0.001	< 0.001	0.002	0.344
Lipid metabolism							
Total cholesterol, mg/dL	123.60 ± 1.78	136.20 ± 2.92	163.70 ± 7.21	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002
HDL-C, mg/dL	32.25 ± 0.65	40.18 ± 0.97	49.96 ± 2.58	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.016
LDL-C, mg/dL	72.93 ± 1.41	79.10 ± 2.26	95.96 ± 6.72	< 0.001	0.070	< 0.001	0.070
VLDL-C, mg/dL	17.26 ± 0.52	15.29 ± 0.63	16.71 ± 1.34	0.048	0.043	0.999	0.821
Inflammation							
CRP, mg/L	5.47 ± 0.33	3.51 ± 0.32	1.28 ± 0.12	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001


SE: Standard error; RBC: Red blood cells; LDH: Lactate dehydrogenase; WBC: White blood cells; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: Very low-density lipoprotein cholesterol; CRP: C-reactive protein. *p* value obtained using the Kruskal-Wallis test. Comparisons between groups were obtained using Dunn's multiple comparisons test.

<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2018.07.002>

Received 22 June 2018; Received in revised form 12 July 2018; Accepted 13 July 2018
1079-9796/© 2018 Published by Elsevier Inc.

Research Article

Genetic Polymorphisms Associated with Environmental Exposure to Polycyclic Derivatives in African Children

Rodrigo Mota de Oliveira,^{1,2} Camylla Vilas Boas Figueiredo,^{1,2} Rayra Pereira Santiago,^{1,2} Sètonджи Cocou Modeste Alexandre Yahouédéhou,^{1,2} Suéllen Pinheiro Carvalho,^{1,2} Silvana Souza da Paz,² Luciana Magalhães Fiuza,² Fernando Nunes de Miranda,¹ Caroline Conceição da Guarda,² Cleverson Alves Fonseca,¹ Milena Magalhães Aleluia,² Cynara Gomes Barbosa,¹ Elisângela Vitória Adorno,¹ and Marilda de Souza Gonçalves^{1,2} 

¹Laboratório de Pesquisa em Anemia (LPA), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão do Jeremoabo, no. 147, Ondina, 40.170-115 Salvador, BA, Brazil

²Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional (LIGHT), Instituto Gonçalo Moniz (IGM), FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121 Candeal, 40.296-710 Salvador, BA, Brazil

Correspondence should be addressed to Marilda de Souza Gonçalves; mari@bahia.fiocruz.br

Received 26 February 2018; Revised 29 April 2018; Accepted 17 May 2018; Published 1 August 2018

Academic Editor: Silvia Angeletti

Copyright © 2018 Rodrigo Mota de Oliveira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The nonracial leukopenia may be a result of exposure to polycyclic derivatives (benzene-toluene-xylene (BTX)) and may arise from a possible change in the bone marrow microenvironment. The present study sought to evaluate the association of genetic polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes with hematological and biochemical profiles. **Methods.** We evaluated 89 African descendant children, exposed indirectly to benzene derivatives. Laboratory parameters were investigated by automated methods and genetic polymorphisms by PCR-RFLP and PCR multiplex. **Results.** Children with leukopenia had significantly decreased white blood cells (WBCs) and platelet counts, which is not consistent with benign leukopenia. In the same group, we have found that carriers of the *CYP2E1* variant allele had decreased WBC and lymphocytes. Those with *NQO1* variant allele had decreased WBC, neutrophil, eosinophil, monocyte, and lymphocyte counts. Carriers of the *MPO* variant allele had decreased WBC, neutrophil, eosinophil, basophil, monocyte, lymphocyte, and platelet counts and an elevated free iron level. Children with *GSTT* and *GSTM* null exhibited decreased WBC, neutrophil, basophil, and lymphocyte counts. Our multivariate analysis model reveals that females were independently associated with leukopenia. **Conclusion.** Our results suggest that the polymorphisms investigated were associated with hematological changes in the studied population. These alterations could be heightened by exposure to benzene derivatives.

1. Introduction

Xenobiotic compounds are classified as any foreign chemical substance inside the biological system. Most xenobiotics that the humans are exposed come from environmental pollution, food additives, cosmetics, agricultural products, toxic agents, and drugs. Usually xenobiotics are lipophilic, and if they do not undergo regular metabolism, they can be potentially harmful to exposed humans. Under physiological conditions, humans exhibit mechanisms responsible for enzymatic

metabolism or biotransformation of xenobiotics. This involves the biotransformation based on phase I and phase II reactions. During the first phase, the oxidation and reduction of hydrophobic chemicals occur, while in the second phase the conjugation reactions (acetylation, methylation, and glucuronidation) take place in order to remove the byproducts from the human organism as urine or sweat [1, 2].

Human exposure to refining and petroleum refinery process derivatives can happen indirectly in the environment.

RESEARCH

Open Access



Association of classical markers and establishment of the dyslipidemic sub-phenotype of sickle cell anemia

Milena Magalhães Aleluia^{1,2}, Caroline Conceição da Guarda^{1,2}, Rayra Pereira Santiago^{1,2}, Teresa Cristina Cardoso Fonseca^{3,4}, Fábila Idalina Neves³, Regiana Quinto de Souza^{3,4}, Larissa Alves Farias⁴, Felipe Araújo Pimenta⁴, Luciana Magalhães Fiuza^{1,2}, Thassila Nogueira Pitanga¹, Júnia Raquel Dutra Ferreira^{1,2}, Elisângela Vitória Adorno², Bruno Antônio Veloso Cerqueira⁵ and Marilda de Souza Gonçalves^{1,2*}

Abstract

Background: Sickle cell anemia (SCA) patients exhibit sub-phenotypes associated to hemolysis and vaso-occlusion. The disease has a chronic inflammatory nature that has been also associated to alterations in the lipid profile. This study aims to analyze hematological and biochemical parameters to provide knowledge about the SCA sub-phenotypes previously described and suggest a dyslipidemic sub-phenotype.

Methods: A cross-sectional study was conducted from 2013 to 2014, and 99 SCA patients in steady state were enrolled. We assessed correlations and associations with hematological and biochemical data and investigated the co-inheritance of α -^{3.7Kb}-thalassemia (α -^{3.7Kb}-thal). Correlation analyses were performed using Spearman and Pearson coefficient. The median of quantitative variables between two groups was compared using *t*-test and Mann-Whitney. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

Results: We found significant association of high lactate dehydrogenase levels with decreased red blood cell count and hematocrit as well as high levels of total and indirect bilirubin. SCA patients with low nitric oxide metabolites had high total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol and reduced very low-density cholesterol, triglycerides, direct bilirubin level and reticulocyte counts. In SCA patients with high-density lipoprotein cholesterol greater than 40 mg/dL, we observed increased red blood cell count, hemoglobin, hematocrit, and fetal hemoglobin and decreased nitric oxide metabolites levels. The presence of α -^{3.7Kb}-thal was associated with high red blood cell count and low mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, platelet count and total and indirect bilirubin levels.

Conclusions: Our results provide additional information about the association between biomarkers and co-inheritance of α -^{3.7Kb}-thal in SCA, and suggest the role of dyslipidemia and nitric oxide metabolites in the characterization of this sub-phenotype.

Keywords: Sub-phenotype, Sickle cell anemia, Dyslipidemia, α -thalassemia

* Correspondence: mari@bahia.fiocruz.br

¹Laboratório de Hematologia e Genética Computacional, Instituto Gonçalo Moniz - IGM, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, Bahia, Brazil

²Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Research Article

Laboratory and Genetic Biomarkers Associated with Cerebral Blood Flow Velocity in Hemoglobin SC Disease

Rayra Pereira Santiago,^{1,2} Camilo Vieira,³ Corynne Stephanie Ahouefa Adanho,^{1,2} Sanzio Silva Santana,^{1,2} Caroline Conceição Guarda,^{1,2} Camylla Vilas Boas Figueiredo,^{1,2} Luciana Magalhães Fiuza,^{1,2} Thassila Nogueira Pitanga,^{1,2} Junia Raquel Dutra Ferreira,^{1,2} Milena Magalhães Aleluia,^{1,2} Rodrigo Mota Oliveira,^{1,2} Dalila Luciola Zanette,¹ Isa Menezes Lyra,^{4,5} and Marilda Souza Goncalves^{1,2}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40.296-710 Salvador, BA, Brazil

²Universidade Federal da Bahia, Avenida Adhemar de Barros, s/n, Ondina, 40.170-110 Salvador, BA, Brazil

³Ambulatório Pediátrico de Doença Cerebrovascular, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua Augusto Viana, s/n, Canela, 40110-060 Salvador, BA, Brazil

⁴Serviço de Pediatria, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua Augusto Viana, s/n, Canela, 40110-060 Salvador, BA, Brazil

⁵Universidade Salvador, Laureate International Universities, Av. Luís Viana, 3146, Imbui, 41720-200 Salvador, BA, Brazil

Correspondence should be addressed to Marilda Souza Goncalves; mari@bahia.fiocruz.br

Received 8 January 2017; Revised 15 April 2017; Accepted 31 May 2017; Published 16 July 2017

Academic Editor: Dennis W. T. Nilsen

Copyright © 2017 Rayra Pereira Santiago et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Reference values for cerebral blood flow velocity (CBFV) in hemoglobin SC disease (HbSC) have not been established. We aimed to investigate associations between laboratory and genetic biomarkers associated with CBFV in HbSC children. Sixty-eight HbSC children were included; CBFV was analyzed by transcranial Doppler, and the time-averaged maximum mean velocity (TAMMV) was estimated. Hematological, biochemical, immunological, and genetic analyses were performed. TAMMV was negatively correlated with red blood cell count (RBC) count, hemoglobin, hematocrit, and direct bilirubin (DB), yet positively correlated with monocytes and ferritin. We found that children with TAMMV ≥ 128 cm/s had decreased red blood cell distribution width (RDW) and nitric oxide metabolite (NOx) concentration. Children with TAMMV ≥ 143.50 cm/s had decreased hemoglobin and hematocrit, as well as increased ferritin levels. Decreased hemoglobin, hematocrit, RDW, and NOx and increased ferritin were detected in children with TAMMV ≥ 125.75 cm/s. The CAR haplotype was associated with higher TAMMV. In association analyses, RBC, hemoglobin, hematocrit, RDW, monocyte, DB, NOx, and ferritin, as well as the CAR haplotype, were found to be associated with higher TAMMV in HbSC children. Multivariate analysis suggested that high TAMMV was independently associated with hematocrit, RDW, and NOx. Additional studies are warranted to validate the establishment of a cutoff value of 125.75 cm/s associated with elevated TAMMV in HbSC children.

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) is characterized by the presence of hemoglobin S (HbS). The HbSS genotype, in which the beta allele S (β^S) is homozygous, is known as sickle cell anemia (SCA), the most severe type of SCD. In

HbS- β^0 thalassemia, another severe form of SCD, the beta allele S is present in association with the absence of synthesis of the β gene on the second chromosome. In hemoglobin SC disease (HbSC), there is an association of HbS with another hemoglobin variant, HbC (β^C), that results in a typically milder form of SCD [1].

Vidriales, M., Sempere, A., Ángel Díaz, J., Minguela, A., Álvarez, B., Serrano, C., Caballero, T., Rey, M., Pérez Corral, A., Cristina Fernández Jiménez, M., Magro, E., Lemes, A., Benavente, C., Bañas, H., Merino, J., Castejon, C., Gutierrez, O., Rabasa, P., Vescosi Gonçalves, M., Perez-Andres, M. & Orfao, A.; PNH working group of the Iberian Society of Cytometry (SIC). (2016) Diagnostic screening

of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: prospective multicentric evaluation of the current medical indications. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21480>

Movalia, M., Weitz, I., Lim, S. & Illingworth, A. (2011) Incidence of PNH clones by diagnostic code utilising high sensitivity flow cytometry. *Blood*, **118**, 1033.

Wang, S., Pozdnyakova, O., Jorgensen, J., Medeiros, J., Stachurski, D., Anderson, M., Raza, A. & Woda, B. (2009) Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica*, **94**, 29–37.

Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients

Sickle cell anaemia (SCA) is a chronic inflammatory disease with a complex mechanism of pathogenesis. The rheological phenomenon of SCA has been directly associated with the activation of sickle red blood cells, reticulocytes, leucocytes, platelets and endothelial cells, with the expression of several molecules secondarily expressed in this inflammatory environment and on the surface of these cells (Ware *et al*, 2017).

Although inflammatory mediators have been studied among SCA patients, the immunological and inflammatory mechanisms associated with the disease pathogenesis, endothelial activation and dysfunction, and repair mechanisms, as well as their roles as biomarkers of the crisis and steady states, remain unclear.

Considering the complex network of mechanisms involved in SCA pathogenesis, we investigated systemic levels of cytokines, including tumour necrosis factor- α (TNF- α); interleukin (IL) 1 β , IL6, IL8, IL10, and IL12; and transforming growth factor beta (TGF- β). We also investigated inflammatory mediators, such as prostaglandin E₂ (PGE₂), leukotriene B₄ (LTB₄) and the vascular remodelling modulators matrix metalloproteinase-9 (MMP9) and its inhibitor, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), and free haem levels. To test the hypothesis that systemic levels of these molecules can be associated with steady and crisis states in SCA patients, we investigated the haematological and biochemical markers of oxidative stress, haemolysis and inflammation to identify biomarkers of prognosis, establishing risk factors for each phase of the disease.

We evaluated haematological, biochemical and immunological parameters in 101 stable SCA patients, 23 SCA patients in vaso-occlusive crisis (crisis state) and 146 healthy control individuals.

The human subject research board of the Instituto Gonçalo Moniz- Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ) and the Hospital da Criança das Obras Sociais Irmã Dulce (HCOSID) approved this study, with protocol number

0016.0.225.000-09. Each child's guardian signed the consent form, and the study followed the Brazilian standards for the development of research on humans. The present work is in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 and its revision. More information is available in Data S1.

All analyses were performed using the EPI Info™ 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia, USA) and Graphpad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) software, considering *P* values <0.05 significant. Baseline values of selected variables are expressed as means. The Kolmogorov–Smirnov test was used to determine quantitative variable distribution. The Mann–Whitney test and independent *t*-test were used to compare two numerical variables according to distribution. Additionally, the receiver operator characteristics (ROC) curve and C-statistics analyses were performed to estimate the predicted disease severity for acute and chronic events using data from each candidate SCA biomarker.

Characteristics of the SCA patient groups and the healthy control group are described in Tables S1 and S2. As expected, the crisis state SCA patients had the lowest haematological and chemical marker concentrations. Our results show that LTB₄, PGE₂ and TGF- β were increased in steady state SCA patients. In addition, higher concentrations of haem, TIMP1, and MMP9 were increased in both patient groups (steady and crisis state) (Fig 1A–G).

The inflammatory cytokines IL1 β , IL6, IL10 and TNF- α were increased in SCA patients in crisis state, and IL12 and IL8 were increased in both crisis and steady state SCA patients (Fig 2A–G).

The ROC curve showed a predictive power and demonstrates that LTB₄, TGF- β and PGE₂ serve as markers of steady state SCA, whereas TNF- α , IL1 β and IL10 serve as markers of crisis state SCA (Figure S1).

Inflammation is a complex mechanism modulated by several cell types as well as many different molecules. In this context, the inflammatory response in SCA is driven by a



Leptin – 2548 G > A gene polymorphism is associated with lipids metabolism and TGF- β alteration in sickle cell disease



Camylla Vilas Boas Figueiredo^{a,b}, Magda Oliveira Seixas Carvalho^c, Rayra Pereira Santiago^{a,b}, Sânzio Silva Santana^{a,b}, Rodrigo Mota de Oliveira^b, Luciana Magalhães Fiuza^{a,b}, Caroline Conceição da Guarda^{a,b}, Milena Magalhães Aleluia^{a,b}, Valma Maria Lopes do Nascimento^d, Isa Menezes Lyra^{c,d}, Junia Raquel Dutra Ferreira^{a,b}, Marilda de Souza Goncalves^{a,b,*}

^a Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP: 40.296-710 Salvador, Bahia, Brazil

^b Universidade Federal da Bahia, Av. Barão de Geremoabo, Campus Universitário de Ondina, CEP: 40.000-000 Salvador, Bahia, Brazil

^c Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua Augusto Viana, sn°, Canela, CEP: 40110-060 Salvador, Bahia, Brazil

^d Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), Av. Vasco da Gama, s/n° Rio Vermelho, CEP: 40.240-090 Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2015

Revised 6 September 2016

Accepted 3 October 2016

Available online 05 October 2016

Keywords:

Sickle cell disease

Leptin

TGF- β

Gene polymorphism

ABSTRACT

Background: Leptin is a protein with regulatory role in several body systems such as the immune system, and energy balance. Given that patients with sickle cell disease (SCD) have changes in cellular immunity and lipid metabolism, it is important to conduct research aimed understand the role of leptin in the pathophysiology of SCD. **Results:** We studied 103 patients with SCD from Northeast of Brazil in a case-control study. The investigation of the leptin – 2548 G > A polymorphism in SCD individuals shows the frequency of 60.20% (62/103) for the wild genotype (GG); 34.95% (36/103) for the heterozygous genotype (AG) and 4.85% (5/103) for the variant homozygote genotype (AA). In the healthy volunteers group the polymorphism investigation indicated the frequency of 58.24% (53/91) for the wild genotype (GG); 37.36% (34/91) for the heterozygous genotype (AG) and 4.40% (4/91) for the variant homozygote genotype (AA). The AA genotype was associated with increased levels of very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and triglycerides among SCD patients. Furthermore, the presence of allele A was associated with the highest levels of transforming growth factor beta (TGF- β) in SCD patients. **Conclusion:** The results suggest that the presence of the variant allele may influence the disturbances in lipid metabolism and serum levels of TGF- β described in SCD patients.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Sickle cell disease (SCD) designates a group of diseases that has in common the presence of the beta S allele (β^S) that can be found in homozygous state called sickle cell anemia (SCA) or in heterozygous paired with other alleles from variants hemoglobin. The hemoglobin S (HbS) is a variant hemoglobin resulting from GAG \rightarrow GTG point mutation in the sixth codon of the beta globin gene (*HBB*) where valine replaces glutamic acid on the beta polypeptide chain (Silla, 1999; Steinberg, 2009). Clinical symptoms associated with the SCD are heterogeneous, with the presence of severe hemolytic anemia, pain crises, vaso-occlusive events, high susceptibility of infection, pulmonary hypertension, priapism, leg ulcers, and stroke among other clinical events (Ghosh et al., 2014).

Inflammation on SCD is also driven by several cytokines, such as transforming growth factors-beta (TGF- β), which are a pleiotropic

cytokine family that can acts in both pro-inflammatory and anti-inflammatory pathways. Episodes of pain, occurrence of infection, stroke, leg ulcers, priapism, acute chest syndrome, pulmonary hypertension and renal failure are important clinical manifestations, being associated with higher levels of TGF- β (Nolan et al., 2006; Pereira et al., 2014). Lipids are also involved on the inflammatory milieu of SCD, and dyslipidemia has been described among SCD patients. Alterations in plasma cholesterol concentrations were reported in SCD, and studies demonstrated the association between decreased levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and increased levels of very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and triglycerides as biomarkers related to inflammation among this patient group (Seixas et al., 2010; Zorca et al., 2010).

Leptin is a peptide hormone secreted by adipocytes, formed by 167 amino acids, has a molecular weight of 16 kDa, transcribed from the *ob* gene in mice, and serves as an integral component in the physiological system, regulating the storage, balance and the use of energy by the body (Negrão and Licinio, 2000). Studies suggest that leptin also has the role of modulating the immune response, acting on inflammatory processes and immune-mediated pathologies.

* Corresponding author at: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, CEP: 40.295-001 Salvador, Bahia, Brazil.
E-mail address: mari@bahia.fiocruz.br (M.S. Goncalves).

B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**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: “Alfa-1-Antitripsina e Anemia Falciforme: Avaliação Genética, Proteômica e de Mecanismos Associados a Inflamação e a Homeostase Sanguínea ”, uma vez que oficialmente é o seu representante legal.

A participação do menor é totalmente voluntária e a sua permissão para a sua participação no estudo 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 pelas células vermelhas que possuem o formato de foice, podendo também possuir infecção e outros tipos de alterações clínicas tais como alteração nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

Nessa pesquisa serão investigados pacientes com anemia falciforme, que possuem a hemoglobina S, alteração que muda a forma das células vermelhas que ficam rígidas, facilitando a obstrução de veias e juntamente com as células brancas participam das crises de dor e podem contribuir para a ocorrência de derrame, problemas no coração, nos olhos, nervos e pulmões. O sangue retirado será destinado ao estudo do DNA, RNA, células brancas e de algumas substâncias que ajudam na ligação das células às veias, além do estudo de fatores que contribuem para os fenômenos de vaso-occlusão.

Tendo em vista os motivos apresentados, convidamos o menor _____ 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. Os dados individuais dos exames e informações do prontuário 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 20 ml de sangue**, quantidade igual a três colheres de sopa cheia, para que possamos ser realizados o estudo das células do sangue, do DNA e RNA. 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 466/12 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuir para a obtenção de conhecimentos novos relacionados à doença.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço, podendo 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. 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 diretos, mas possibilitará a realização de exames que não são realizados na rotina, podendo trazer informações importantes referentes à anemia falciforme, proporcionando a obtenção de dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento dos pacientes, na busca de novos medicamentos e na implantação de políticas de saúde.

Você teve todas as explicações sobre o projeto e receberá uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Por favor, entre em contato com a pesquisadora responsável pelo desenvolvimento do projeto, caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Se tiver qualquer dúvida, você pode procurar a Dra. Marilda de Souza Gonçalves na FIOCRUZ (telefone: 3176-2226), ou a aluna Caroline Conceição da Guarda (telefone: 3176-2256).

C - QUESTIONÁRIO

Projeto: Alfa 1-antitripsina e Anemia Falciforme: Avaliação molecular e proteômica de mecanismos associados à inflamação e a homeostase sanguínea

QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES E CONTROLES

Nome: {NOME} _____ Sigla: {sig} _____ Telefone: () _____

Endereço: _____

Registro: {REG} _____ Nº Pront. HEMOBA: {PRON} _____ Data de Nasc.: ___/___/___

Idade: {I} _____ Gênero: {GENER} () Masculino [0] () Feminino [1]

01. Qual a sua cor? {cor} () Branca[0] () Negra[1] () Parda[2] () Amarela[3] () Indígena[4]

02. Você estuda? {EST} () NÃO [0] () SIM [1]

03. Nível de escolaridade: {NESC} () Alfabetiz.[0] () Até 4 FM[1] () Até 8 FM[2] () Até 3 MD[3]

04. Número de irmãos: {NIRM} () 0 [0] () 1 [1] () 2 [2] () 3 [3] () 4 ou + [4]

05. Familiares com DF? {FDFALC} () Nenhum[0] () Pai [1] () Mãe [2] () Irmão [3]

06. Idade primeira menstruação: {IPM} () Não menst.[0] () 09-11[1] () 12-14 [2] () 15-17 [3]

07. Já engravidou? {ENGRA} () NÃO [0] () SIM [1]

08. Está grávida? {GRA} () NÃO [0] () SIM [1]

09. Usa anticoncepcional? {ANTICO} () NÃO [0] () SIM [1]

10. Menstruação é regular? {MREG} () NÃO [0] () SIM [1]

11. Idade do 1º diagnóstico de Doença Falciforme: {ID} () <6 m [0] () 6m - 4anos [1] () 5 - 9anos [2]
() 10 - 14anos [3] () 15 - 17anos [4]

12. Eletroforese de Hb {EHB} () AA[0] () SS[1] () SC[2] () SB+[3] () SB₀[4]
() SD[5]

13. Haplótipo {HAPL} () Sen[0] () Car[1] () Ben[2] () Cam[3] () Sau-Ara [4]
() Atip[5] () I[6] () II[7] () III[8]

14. Talassemia {TAL} () Negativo[0] () Hetero 3.7[1] () Homo 3.7[2]
() Hetero 4.2[3] () Homo 4.2[4]

Mieloperoxidase {MPO} () GG[0] () AG[1] () AA[2]

Alelo mutante Mieloperoxidase ? {MUTMPO} () NÃO [0] () SIM [1]

Alfa 1 antitripsina {A1ATP} () MM[0] () MZ[1] () MS[2]
() SZ[3] () SS[4] () ZZ[5]

15. Já esteve internado? {INTER} () NÃO [0] () SIM [1]
Se SIM, quantas vezes? {QINTER} () 1 [0] () 2-5 [1] () 6-10 [2] () 11 ou + [3]

24. Vaso-Oclusão: {VO} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QVO} _____
 Fez uso de alguma medicação? {MVO} () NÃO [0] () SIM [1]
25. Retinopatia: {RETIN} () NÃO [1] () SIM [2]
 Se SIM, fez uso de alguma medicação? {MRETIN} () NÃO [0] () SIM [1]
 Faz consultas periódicas com oftalmologista? {CONSOFTAL} () NÃO [0] () SIM [1]
26. Infecções: {INFEC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCINFEC} () Rinite [0] () Sinusite [1] () Otite [2]
 () Faringite [3] () Amigdalite [4] () Outros [5]
 Fez uso de alguma medicação? {MINFEC} () SIM [0] () NÃO [1]
27. Priapismo: {PRIAP} () NÃO [0] () SIM [1]
 Nº de vezes: {QPRIAP} () Até 4 [0] () 05-09 [1] () 10 ou + [2]
 Fez uso de alguma medicação? {MPRIAP} () NÃO [0] () SIM [1]
28. Úlcera maleolar: {ULCMALEO} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QULCMALEO} _____
 Idade da primeira úlcera: {IDULC} () Até 4 anos [0] () 5-9 [1] () 10 ou + [2]
 Tratou a úlcera? {TRATULC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual tratamento? {QUALTRAT} _____
29. Síndrome torácica aguda: {SDTOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quantas vezes? {QSDTOR} () Até 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
30. Alterações ósseas: {ALTOSSEA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCALTOSSEA} _____
31. Insuficiência Renal Aguda: {INSRENAG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quantas vezes? {QINSRENAG} () Até 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
32. Insuficiência Renal Crônica: {INSRENCRO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Idade diagnóstico: {IDINSRENCRO} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
33. Alterações cardíacas: {INSCARD} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual alteração? {QUALALTCA} _____
 Idade diagnóstico: {IDINSCARD} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
 Fez eletrocardiograma? {ELETRO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Fez ecocardiograma? {ECOCARD} () NÃO [0] () SIM [1]
34. Seqüestro hepático: {SEQHEP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QSEQHEP} _____
35. Insuficiência respiratória: {INSRESP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QINSRESP} _____
36. Distúrbio do sono? {DISTSONO} () NÃO [0] () SIM [1]
37. Litíase biliar: {LITIBILI} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QLITIBILI} _____
38. Cirurgia: {CIRURG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {QUALCIRURG} _____
39. Se SIM, fez uso de profilaxia antibiótica? {PROFANTIB} () NÃO [0] () SIM [1]
40. Completou o calendário vacinal? {CALVAC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Fez uso das seguintes vacinas? {USOVAC} () 7 valente [0] () 23 valente [1]
 () Meningo [2] () Haemophilus [3]
41. Faz uso de hemoderivados? {HEMODER} () NÃO [0] () SIM [1]

- Se SIM, quantas vezes ao ano? {QHEMODER} _____
42. Possui outra patologia? {PATOLOG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCPATOLOG} () Hipertensão [0] () Diabetes [1] () Obesidade [2] () Outras [3]
43. Você trabalha? {TRAB} () NÃO [0] () SIM [1]
 Tipo de profissão: {QTRAB} _____
- Se SIM, manipula alguma substância química? {SUBQUIM} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual? {QSUBQUIM} _____ Freqüência ? {FREQSUBQUI} _____
- Manipula diretamente esta subst? {MANIDIRE} () NÃO [0] () SIM [1]
44. Pratica esportes? {ESPOR} () NÃO [0] () SIM [1]
45. Faz uso de bebida alcoólica? {BEBE} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, que freqüência? {FREQBEBE} _____
46. Você fuma? {FUMA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, que freqüência? {FREQFUMA} _____
47. Faz uso de alguma droga? {DROGA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Em caso de SIM, que freqüência? {FREQDROGA} _____
48. Além dos seus pais quantos membros da família ou parentes são apegados a vc? {APEG}
 () 01[0] () 02 – 03 [1] () 04 – 06[2] () 07 – 10[3] () nenhum[4]
49. Quantos amigos vc têm aproximadamente? {AMIGO}
 () 01[0] () 02 – 03 [1] () 04 – 06[2] () 07 – 10[3] () nenhum[4]
50. Com que freqüência vc se reúne com seus parentes, amigos ou vizinhos? {REUNI}
 () Diariamente ou quase todos os dias [0] () Várias vezes na semana [1]
 () Várias vezes no mês [2] () Várias vezes por ano [3] () Quase nunca [4]
- Data da próxima consulta no HEMOBA: ____/____/____

D – CEP

HOSPITAL SÃO
RAFAEL/MONTE TABOR-BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALFA-1-ANTITRIPSINA E ANEMIA FALCIFORME: AVALIAÇÃO GENÉTICA, PROTEÔMICA E DE MECANISMOS ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO E A HOMEOSTASE SANGUÍNEA

Pesquisador: Marilda Gonçalves

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 52280015.1.0000.0048

Instituição Proponente: Hospital São Rafael/Monte Tabor-BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.400.535

Apresentação do Projeto:

A doença falciforme (DF) é caracterizada pela presença de hemoglobina S (HbS) em homozigose ou heterozigose duplo com outras variantes de hemoglobina e hemoglobinopatias de síntese. A HbS é devido à mutação GAG GTG no sexto codon do gene da beta-globina (gene HBB) onde a valina substituir o ácido glutâmico na posição seis da cadeia beta polipeptídico. O quadro clínico da anemia hemolítica varia de DF para crises dolorosas, com a ocorrência de oclusão dos vasos sanguíneos, inflamação e tecidual. Indivíduos com anemia falciforme apresentam mortalidade elevada, sendo que a busca de novos biomarcadores de prognóstico é de grande interesse, uma vez que pode contribuir para modificar a história natural da doença. O estado da Bahia tem a maior incidência brasileira de SCD, dados confirmados pela triagem neonatal e da diversidade étnica da população, que tem uma predominância de ascendência africana, população historicamente mais afetada pela doença. A alfa-1-antitripsina (A1AT) é

Endereço: Av. São Rafael 2152, 6º andar

Bairro: São Marcos

CEP: 41.256-900

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3281-6484

Fax: (71)3281-6855

E-mail: cep@hsr.com.br

HOSPITAL SÃO
RAFAEL/MONTE TABOR-BA



Continuação do Parecer: 1.400.535

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_626122.pdf	13/11/2015 00:02:35		Aceito
Folha de Rosto	FRCarol.pdf	13/11/2015 00:01:34	Marilda Gonçalves	Aceito
Orçamento	carol2.pdf	12/11/2015 23:50:22	Marilda Gonçalves	Aceito
Orçamento	carol1.pdf	12/11/2015 23:49:46	Marilda Gonçalves	Aceito
Orçamento	Carol.pdf	12/11/2015 23:49:31	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_Alfa.png	12/11/2015 23:32:22	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_AAT.pdf	12/11/2015 22:45:18	Marilda Gonçalves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_AAT.pdf	12/11/2015 22:28:13	Marilda Gonçalves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termos.pdf	12/11/2015 22:27:45	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	TermodeCompromissoparaUtiliacaodeDadoseProntuarios_AAT.pdf	12/11/2015 22:25:43	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_coberturadoscustosdapesquisa_AAT.pdf	12/11/2015 22:23:53	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	Curriculum_VITAE_Marilda_AAT.pdf	12/11/2015 22:23:02	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	Curriculum_VITAE_AAT.pdf	12/11/2015 22:22:09	Marilda Gonçalves	Aceito
Outros	Declaracao_do_orientador_AAT.pdf	12/11/2015 22:20:45	Marilda Gonçalves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_do_Pesquisador_Participante_AAT.pdf	12/11/2015 22:19:23	Marilda Gonçalves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 02 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Regina Maria Pereira Oliveira
(Coordenador)