



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES *IFNG* E *IL4* EM ASSOCIAÇÃO  
COM A OCORRÊNCIA DO AVC EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME**

por

ANTONIO MATEUS DE JESUS OLIVEIRA

**TCC** apresentado ao Instituto de Biologia  
da Universidade Federal Bahia como exigência  
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas

Salvador, BA  
(2020)

Data da defesa: 17 de dezembro de 2020

**Banca Examinadora**

Marilda de Souza Gonçalves

---

**Orientadora**

Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Luciana Magalhães Fiuza

---

**Co-orientadora**

Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Renata Lúcia Leite Ferreira de Lima

---

**1º. membro da banca**

Universidade Federal da Bahia

Cynara Barbosa Gomes

---

**2º. membro da banca**

Universidade Federal da Bahia

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é caracterizada pela apresentação de diversas manifestações clínicas oriundas de eventos vaso-oclusivos, hemolíticos e inflamatórios, que são resultantes das alterações eritrocitárias causadas pela hemoglobina variante S (HbS). O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais manifestações clínicas na AF. A literatura tem sugerido que a presença de polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias pode estar associados à de ocorrência do AVC. O presente estudo tem como objetivo analisar os parâmetros laboratoriais, bem como investigar a presença de polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias, tais como *IL4* -590 C>T e *IFNG* +874 T>A, associando-os a parâmetros clínicos, visando elucidar associações. A casuística foi composta por 66 indivíduos com AF, sendo 24 com histórico do AVC e 42 sem histórico, compreendendo o controle. Os parâmetros laboratoriais foram avaliados por métodos automatizados e a análise molecular foi realizada pela técnica de PCR-RFLP e PCR-ASO. A análise dos parâmetros laboratoriais revelou um aumento na contagem de reticulócitos nos indivíduos do grupo caso ( $p=0,0101$ ). Também foi encontrada associação entre o AVC e a dosagem de albumina ( $p=0,0006$ ), proteínas totais ( $p=0,0087$ ) e ácido úrico ( $p=0,395$ ). Frequência elevada foi encontrada para o alelo mutante do gene *IFNG* na população estudada e uma associação significativa entre a presença do polimorfismo -590 C>T no gene *IL4* e alguns parâmetros laboratoriais como contagem de linfócitos ( $p=0,0152$ ), plaquetas ( $p=0,0203$ ), proteínas totais ( $p=0,227$ ) e bilirrubina direta ( $p=0,0054$ ). Para os parâmetros laboratoriais nos indivíduos com AF, foi elucidado uma associação entre a presença do alelo T no gene *IL4* e marcadores, como VCM ( $p=0,0105$ ), HCM ( $p=0,0421$ ), RDW ( $p=0,0105$ ), LDL-C ( $p=0,0351$ ), AST ( $p=0,0292$ ) e bilirrubina total ( $p=0,0468$ ). Além disso, foi encontrada associação significativa entre a presença do alelo mutante no gene da *IL4* e a dosagem de citocinas, como IL-1 $\beta$  ( $p=0,03$ ), IL-8 ( $p=0,0167$ ) e IL-12 ( $p=0,0095$ ). Não foram encontradas associações estatísticas entre os parâmetros avaliados e a presença dos polimorfismos no gene do *IFNG*. Conclui-se que os pacientes com histórico de AVC apresentam alterações estatisticamente significantes nos parâmetros laboratoriais e que o polimorfismo no gene *IL4* apresenta uma associação direta com parâmetros laboratoriais e marcadores inflamatórios na AF.

Palavras-chaves: anemia falciforme, acidente vascular cerebral, inflamação, hemólise, interleucinas-4, interferon gama – IFN- $\gamma$ , polimorfismo genético

## ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is characterized by the presentation of several clinical manifestations arising from vaso-occlusive, hemolytic and inflammatory events, which are the result of erythrocyte changes caused by variant hemoglobin S (HbS). Stroke is one of the main clinical manifestations in SCD. The literature has suggested that the presence of polymorphisms in inflammatory cytokine genes may be associated with the occurrence of strokes. The present study aims to analyze the laboratory parameters, as well as to investigate the presence of polymorphisms in inflammatory cytokine genes, such as *IL4* -590 C> T and *IFNG* +874 T> A, associating it with clinical parameters, in order to elucidate interactions. The sample consisted of 66 individuals with SCD, 24 with a history of stroke and 42 without a history, as control. Laboratory parameters were evaluated by automated methods and molecular analysis was performed using the PCR-RFLP and PCR-ASO technique. The analysis of laboratory parameters revealed an increase in reticulocyte count in individuals in the case group ( $p = 0.0101$ ). An association was also found between stroke and albumin levels ( $p = 0.0006$ ), total proteins ( $p = 0.0087$ ) and uric acid ( $p = 0.395$ ). High frequency was found for the mutant allele of the *IFNG* gene in the studied population and a significant association between the presence of the -590 C> T polymorphism in the *IL4* gene and some laboratory parameters such as lymphocyte count ( $p = 0.0152$ ), platelets ( $p = 0.0203$ ), total proteins ( $p = 0.227$ ) and direct bilirubin ( $p = 0.0054$ ). For laboratory parameters in individuals with SCD, an association between the presence of the T allele in the *IL4* gene and markers, such as VCM ( $p = 0.0105$ ), HCM ( $p = 0.0421$ ), RDW ( $p = 0, 0105$ ), LDL-C ( $p = 0.0351$ ), AST ( $p = 0.0292$ ) and total bilirubin ( $p = 0.0468$ ). In addition, a significant association was found between the presence of the mutant allele in the *IL4* gene and the measurement of cytokines, such as IL-1 $\beta$  ( $p = 0.03$ ), IL-8 ( $p = 0.0167$ ) and IL-12 ( $p = 0.0095$ ). No statistical associations were found between the parameters evaluated and the presence of polymorphisms in the *IFGN* gene. It is concluded that patients with AF and a history of stroke have statistically significant changes in laboratory parameters and that the polymorphism in the *IL4* gene showed a direct association with laboratory parameters and inflammatory markers in AF.

Keywords: sickle cell anemia, stroke, inflammation, hemolysis, tumor necrosis factor (TNF) gamma interferon (INF- $\gamma$ ), genetic polymorphism.

*"I break chains all by myself"*

- Beyoncé

Dedico ao meu avô,  
Milton Souza de Jesus (*in memoriam*)  
por sempre ter acreditado em mim  
e por todo o amor dado

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia, por ser responsável pela minha excelente formação.

Ao Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA, por construir por toda a minha formação científica, e em especialmente ao Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional (LIGHT) por permitir todo o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores, em ordem alfabética, Flora Fernandes, Gilberto Cafezeiro, Kelly Leite, Nora Ney, Renata Lúcia e Sheila Resende por todos os ensinamentos e aprendizados.

Agradeço intensamente a professora Dr. Marilda Gonçalves por toda orientação dada durante esses últimos anos e por todo carinho recebido.

Agradeço aos meus amigos e familiares com destaque para o meu avô Milton Souza (*in memoriam*) que nunca mediu esforços para contribuir para a minha educação, à minha mãe Márcia Ferreira por todo amor e atenção dada, e à minha irmã Alana Francine por sempre ter acreditado em mim e me ajudado nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para a minha jornada, em especial à Patrícia Morgado, que foi um dos precursores para a minha educação superior. Agradeço a Luciana Fiuza por ter sido minha amiga e parceira durante toda a jornada acadêmica. A Hatila Santos, Stéfane Mendes e Vida Souza, por todo o apoio e amizade durante a graduação. A todos que estiveram comigo nesses últimos anos, equipe LIGHT, equipe GENEV e toda comunidade UFBA.

## ÍNDICE

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**ÉPIGRAFE**

**DEDICATÓRIA**

**AGRADECIMENTOS**

**ÍNDICE**..... (i)

**ÍNDICE DAS FIGURAS**.....(ii)

**ÍNDICE DAS TABELAS**.....(iii)

**1. INTRODUÇÃO**..... 1

**2. REVISÃO DA LITERATURA**..... 3

2.1 ANEMIA FALCIFORME ..... 3

2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ..... 6

2.3 CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA..... 8

2.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM CITOCINAS ..... 9

**3. OBJETIVOS** ..... 12

**4. METODOLOGIA**..... 13

4.1 Casuística ..... 13

4.2 Critérios de inclusão ..... 13

4.3 Critérios de exclusão ..... 13

4.4 Análises hematológicas..... 14

4.4 Coleta de amostras ..... 13

4.6 Análises bioquímicas..... 14

4.7 Análises genéticas..... 14

4.8 Dosagem de citocinas ..... 15

4.9 Análises estatísticas ..... 15

**5. RESULTADOS** ..... 16

**6. DISCUSSÃO**..... 24

**7. CONCLUSÃO**..... 39

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 30

**ANEXOS**

## ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA 1- Vaso-oclusão na anemia falciforme.....	5
FIGURA 2- Efeito negativo da IL-4 sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias.....	9
FIGURA 3- Associação dos dados laboratoriais com a ocorrência de AVC.....	21
FIGURA 4- Associação entre dados laboratoriais e polimorfismo <i>IL4</i> -590 C>T.....	22
FIGURA 5 -Associação entre dados laboratoriais e o polimorfismo <i>IL4</i> -590 C>T no grupo caso.....	23

## ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 1 - Características bases dos pacientes.....	18
TABELA 2 - Frequências dos polimorfismos.....	20

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo os dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, o Brasil tem uma ocorrência de cerca de 3.500 crianças por ano com anemia falciforme (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 do alelo S do gene *HBB*, tendo sido encontrada a frequência de 14,7% do genótipo AS em 1.200 crianças em idade escolar (AZEVEDO et al., 1980), variando de acordo com o grupo populacional estudado. O estudo realizado por Adorno e colaboradores (2005), descreveu uma 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 ao estudarem recém-nascidos em Salvador-Bahia. Os dados da triagem neonatal no estado da Bahia mostram a prevalência da doença falciforme (DF) na razão de 1:650 nascidos vivos (BRASIL, 2009).

Pacientes com doença falciforme constituem um grupo expressivo entre indivíduos com doenças genéticas na Bahia (AZEVEDO et al. 1980), podendo apresentar alterações clínicas graves, com internações hospitalares frequentes devido a infecções e decorrente de crises vaso-oclusivas (LEE et al. 1992). Além disso, esses pacientes apresentam risco de falência de órgãos vitais, como o coração, rins e pulmões (SERJEANT, 1993; EMBURY, 1996). O estudo da fisiopatologia da DF tem mostrado que vários fatores podem estar associados ao curso clínico e prognóstico da doença (RODGERS, 1997). Contudo, a presença de determinados fatores pode prever a evolução clínica, principalmente nos casos em que este apresente fatores que levam ao agravamento do quadro clínico.

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma complicação grave e de consequências debilitantes, que acomete 11% dos pacientes com anemia falciforme (AF), sendo mais prevalentes em pacientes pediátricos (ADAMS, 2005). Atualmente, sabe-se que o AVC está relacionado ao comprometimento de grandes vasos, como artéria carótida interna, cerebral média e cerebral anterior (OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2011). Muitos estudos sugerem que a presença de fatores genéticos pode aumentar o risco para o desenvolvimento do AVC, como polimorfismos em genes que expressam moléculas envolvidas na lesão endotelial, trombose e inflamação.

Citocinas são moléculas que atuam mediando a inflamação, atuando na comunicação celular 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. Alterações 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.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma das formas de apresentação da doença falciforme, que é caracterizada pela presença do alelo beta S em homozigose, que leva a presença da hemoglobina mutante S (HbS) em comutação da hemoglobina selvagem A (HbA). Essa alteração é resultado da substituição de uma única base nitrogenada no códon 6 do gene da globina beta (*HBB*), onde a adenina (A) é substituída por timina (T) (CAG→CTC). Esta mutação configura-se como não-sinônima, gerando a substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina na posição  $\beta^6$  da cadeia da globina beta (WARE, 2017). As hemoglobinas variantes HbS quando expostas a baixa oxigenação, tendem a formar polímeros no interior das hemácias e conseqüentemente modificar a estrutura do eritrócito de discoide para um formato alongado, comumente chamado de foice, o que leva ao nome da patologia (CONRAN & BELCHER, 2018). A alteração no formato do eritrócito por sua vez, pode ocasionar lesões no endotélio vascular, além de estar mais suscetível a hemólise intravascular, sendo esses dois fenômenos um dos principais responsáveis por levar a formação de processos inflamatórios intravascular não-infecciosos, com a participação de citocinas e de outros componentes do sangue, tendo o fenômeno vaso-oclusivo como um dos eventos decorrentes (WARE, 2017).

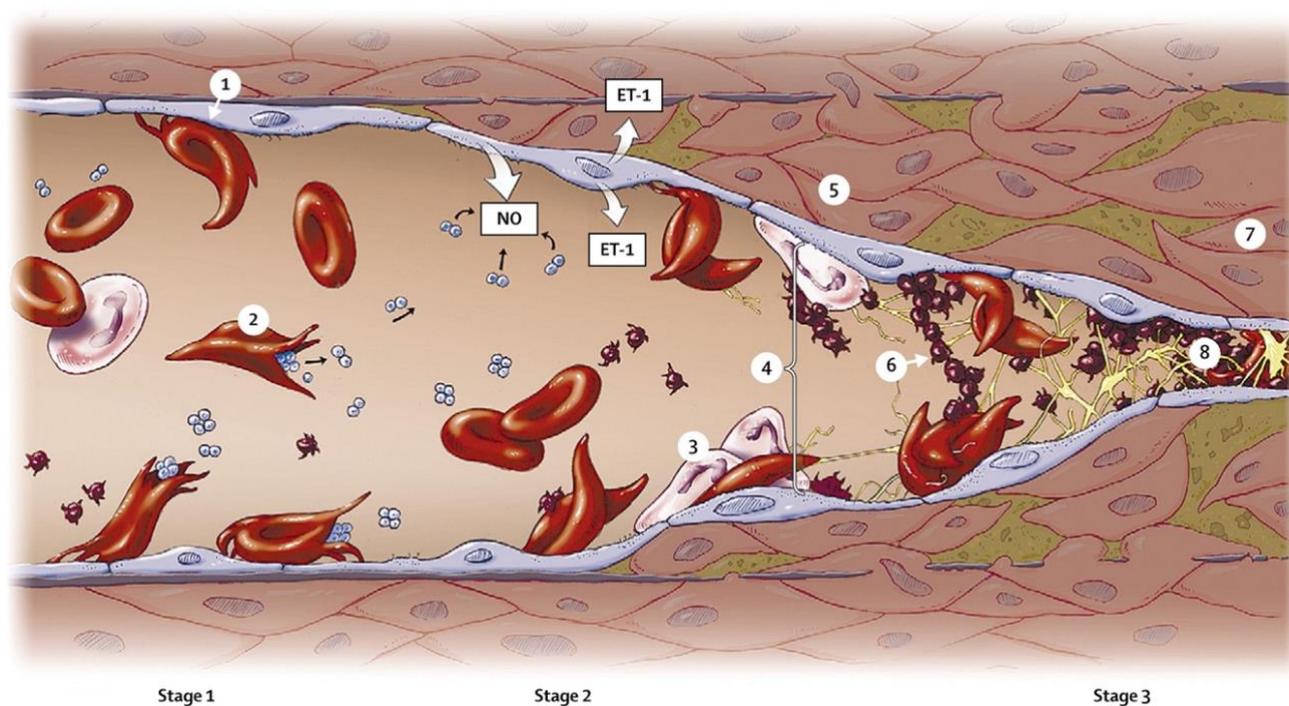
A hemólise presente na AF é resultado das alterações nas hemácias falciformes que deixam os eritrócitos mais rígidos e menos deformáveis e, portanto, mais suscetíveis a ruptura na circulação, levando à liberação intravascular de hemoglobina livre e do heme, um grupamento prostético da hemoglobina, que é caracterizado por ser um importante agente pró-inflamatório na AF, uma vez que ativa diretamente as células endoteliais e macrófagos (WAGENER et al., 2001). Esses processos estão associados à regulação positiva de mediadores pró-inflamatórios, incluindo interleucinas (IL), bem como o fator de necrose tumoral (TNF), além de um aumento da produção de moléculas de adesão que facilitam a adesão de leucócitos circulantes às células endoteliais. Além disso, devido ao

seu efeito eliminador de óxido nítrico (NO), a Hb livre compromete as propriedades anti-inflamatórias do NO no endotélio (DEBAUAN et al., 2014).

A lesão endotelial ocorre a partir da ativação das células endoteliais que desempenha um papel fundamental no processo vaso-oclusivo. O endotélio não ativado evita a adesão de células inflamatórias à parede do vaso a partir de mecanismos como geração de NO e liberação de prostaciclina (TSOUMANI *et al.*, 2012). A disfunção endotelial ocorre como consequência da depleção de NO derivado do endotélio pela hemoglobina livre de células e pelo consumo de L-arginina - um substrato para NO -, pela arginase liberada durante a hemólise (POTOKA *et al.*, 2015). Nesse contexto, o endotélio é ativado por interações e adesão de hemácias falciformes e leucócitos à parede do vaso e uma vez ativado, o endotélio produz e libera uma série de moléculas inflamatórias potentes, incluindo interleucinas, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) -1, proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) e RANTES, que contribuem para o processo inflamatório na AF. O endotélio ativado também expressa moléculas de adesão como VCAM-1 (proteína 1 de adesão celular vascular, do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1, do inglês *intercellular adhesion molecule 1*), E-selectina e P-selectina que possuem importância para a fixação de glóbulos vermelhos, reticulócitos, leucócitos e plaquetas, o que contribui para a ocorrência de fenômenos vaso-oclusivos (CONRAN & BELCHER, 2018).

A vaso-oclusão (figura 1) na AF compreende um processo de múltiplas etapas e múltiplos componentes que consiste na iniciação, propagação e resolução da obstrução vascular, em que numerosos tipos de células e interações moleculares desempenham papéis importantes. A fisiopatologia complexa da doença envolve inflamação crônica vascular, processos de hipóxia-reperfusão, estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico. Dessa forma, ocorre a ativação de células endoteliais, leucócitos e plaquetas, com adesão de hemácias falcizadas, e leucócitos à parede vascular, bem como plaquetas ativadas e reticulócitos, levando ao bloqueio do fluxo sanguíneo (FERREIRA *et al.*, 2014). A membrana dos reticulócitos apresenta expressão de moléculas envolvidas na adesão celular, o que torna essas células mais aderentes ao endotélio vascular (KATO, et al., 2007). A integrina  $\alpha 4 \beta 1$  que está presente na membrana dos reticulócitos, irá se ligar à fibronectina e à VCAM-1 expressas na superfície de células endoteliais (PATHARE et al., 2003). Além disso, associado à ativação plaquetária, ocorre

também o aumento da atividade trombótica com desenvolvimento de um quadro de hipercoagulabilidade sanguínea na AF (LEE *et al.*, 2006). Os processos vaso-oclusivos que ocorrem principalmente na microcirculação, reduzem a oxigenação do tecido e podem culminar em lesão tecidual e um processo de isquemia-reperfusão, que são mecanismos altamente inflamatórios, promovendo assim o surgimento de diversas manifestações clínicas como o AVC (SAEED *et al.*, 2007). Como as interações eritrócito-endotélio são mais proeminentes na microvasculatura, esse mecanismo pode ser um fator responsável para infartos cerebrais vistos em pequenas artérias, especialmente em infartos silenciosos. Além disso, a adesão de hemácias falciformes, quando ativa o endotélio, promove a atividade de fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B) e vasoconstritores (endotelina-1), inibindo o vasorrelaxamento e aumentando a expressão de moléculas de adesão adicionais (VCAM, ICAM), tendo como consequência a remodelação arquitetônica da parede dos vasos e, conseqüentemente, vasculopatia. (SWITZER *et al.*, 2006)



**Figura 1.** Vaso-oclusão na anemia falciforme. (1) Aderência anormal ao endotélio vascular; (2) hemólise; (3) adesão leucocitária; (4) aumento do tônus vasomotor; (5) proliferação de células do músculo liso e fibroblastos dentro da camada íntima; (6) agregação plaquetária; (7) vasculopatia e (8) oclusão. Fonte: SWITZER *et al.*, 2006)

Com isso, pacientes com AF possuem morbidade e mortalidade elevadas, sobretudo devido a complicações clínicas decorrentes de infecções e eventos vasculocclusivos, tais como o AVC. O estudo da fisiopatologia da AF tem mostrado que vários fatores podem estar associados ao curso clínico e prognóstico da doença (RODGERS, 1997). Assim, a presença de determinados fatores na AF pode contribuir para a evolução clínica, favorecendo o agravamento do quadro clínico presente na doença.

## 2.2 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

O *Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (CSSCD) define o AVC como uma síndrome neurológica aguda secundária à oclusão de uma artéria ou hemorragia, com isquemia, sintomas e sinais neurológicos (BALLAS *et al.*, 2009), sendo uma complicação grave de consequências debilitantes. Atualmente, sabe-se que o AVC está relacionado ao comprometimento de grandes vasos, como artéria carótida interna, cerebral média e cerebral anterior e pode ser classificado em AVC isquêmico (AVCi) ou hemorrágico (AVCh) (OHENE- FREMPONG, 1998; STEINBERG, 2011), sendo o AVCi o tipo mais comum em indivíduos com AF (FAROOQ; TESTAI, 2019). Um estudo observacional realizado pelo CSSCD monitorou 4.082 pacientes adultos e crianças com diferentes genótipos da DF durante uma média de 5 anos e, como resultado, obteve uma prevalência geral de 3,75% para a ocorrência do AVC nesses pacientes. Dois picos de prevalência foram observados nas idades de 2 a 5 anos e de 40 a 49 anos, sendo o AVCi mais comum em crianças entre 2 e 5 anos (FAROOQ; TESTAI, 2019). O AVC é uma das complicações mais graves da doença e ocorre em 11% dos pacientes com AF, e as taxas em crianças são particularmente altas (ADAMS, 2005), sendo a maior causa de AVC pediátrico em todo o mundo (DEBAUN & KIRKHAM, 2016).

O AVCi é um déficit neurológico que resulta de uma isquemia seguida de infarto. Essa disfunção sistemática se dá pela obstrução de uma artéria por um trombo, êmbolo ou pela compressão a partir de um tumor. A instauração do quadro clínico acontece de forma rápida em função da ausência de aporte de glicose aos neurônios promovendo a morte do tecido cerebral acometido, após alguns minutos de isquemia (KHOSHNAM *et al.*, 2017). O infarto cerebral, o tipo de AVC mais comum em crianças com AF, tem como fisiopatologia a estenose de grandes artérias que irrigam o cérebro, sendo as porções intracranianas

distais da artéria carótida interna e da artéria cerebral média proximal mais propensas à estenose, que pode ser detectado por um *doppler* transcraniano, um método não invasivo que utiliza o ultrassom para mensurar o fluxo sanguíneo em artérias cranianas, indicando alterações na dinâmica vascular cerebral (WEBB & KWIATKOWSKI, 2013; ADAMS, 2005). Há menos hemorragias em crianças com AF, tendo os derrames infartantes a ocorrência acima de 75% (ADAMS, 2005).

Segundo PALM e colaboradores (2016), os processos inflamatórios possuem importantes associações com o AVCi, sendo considerados como possível fator de causa ou de risco para a ocorrência de oclusão isquêmica. As infecções que promovem o quadro inflamatório sistêmico podem ser consideradas como gatilho para a ocorrência do AVC. Além dos processos infecciosos, as inflamações sistêmicas autoimunes, como as doenças arterioscleróticas e artrite reumatoide, são conhecidas por aumentar significativamente o risco para o desenvolvimento do AVC (DHILLON & LIANG, 2015; MUIR *et al.*, 2007).

No contexto da AF, a aderência de eritrócitos e reticulócitos ao endotélio vascular estão entre as principais alterações vasculares iniciais associadas ao desenvolvimento do AVC, o que resulta em danos às células endoteliais, promovendo a sua ativação. Esse fenômeno estimula o recrutamento de mediadores inflamatórios e de plaquetas, promovendo o quadro de obstrução aguda vascular (CAROLYN *et al.*, 2007; WEBB; KWIATKOWSKI, 2013). Dessa forma, o comprometimento das artérias cerebrais está associado à inflamação crônica, hemólise e anemia (KWIATKOWSKI *et al.*, 2013). Além disso, o AVC em indivíduos com AF vem sendo associado ao aumento da viscosidade sanguínea (WEBB & KWIATKOWSKI, 2013).

A leucocitose, condição em que há aumento significativo dos glóbulos brancos, tem evidenciado o quadro inflamatório crônico em indivíduos com AF, sendo também relacionada com o aumento da mortalidade, bem como o aumento da ocorrência de AVC. (CONRAN & BELCHER, 2018). A inflamação crônica e a ativação do sistema imune inato vêm sendo diretamente associadas ao desenvolvimento do AVC isquêmico (JIN & YANG; LI, 2010; LINDSBERG & GRAU, 2003; TONG *et al.*, 2013), sendo as citocinas inflamatórias consideradas como fatores cruciais dessa manifestação clínica, conforme relatado em estudos em modelos *in vivo* e *ex vivo* (TONG *et al.*, 2013). MUIR e colaboradores (2007), consideram a inflamação como mecanismo importante para possíveis intervenções terapêuticas no contexto do AVC, devido ao seu papel no desencadeamento das mudanças vasculares que culminam na ocorrência desta patologia.

A prevalência de AVC em crianças com AF é de aproximadamente 1% ao ano. Contudo, em indivíduos com velocidades aumentadas de fluxo sanguíneo na artéria carótida interna distal ou na artéria cerebral média identificadas pelo *doppler* transcraniano, o risco anual de AVC aumenta para 10%. A seleção desse subgrupo de alto risco para terapia transfusional mostrou a redução de risco absoluto e relativo de 9% e 92% para a prevenção de um primeiro AVC em um seguimento de 2 anos (ADAMS *et al.*, 1998).

Diversos estudos sugerem que a presença de fatores genéticos pode aumentar o risco para o desenvolvimento do AVC, como polimorfismos em genes que expressam moléculas envolvidas na lesão endotelial, trombose e inflamação. Alguns genes têm sido relacionados a mudanças no equilíbrio hemostático e a processos inflamatórios, como as citocinas (HOPPE *et al.*, 2007).

### 2.3 CITOCINA PRÓ-INFLAMATÓRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA

As citocinas pró-inflamatórias são moléculas proteicas sinalizadoras, que participam da resposta inflamatória, tendo como principais papéis, modular a resposta imune e direcionar o fluxo hematológico para o local da lesão ou infecção (CAMPBELL *et al.*, 2015). As citocinas constituem-se como um amplo grupo de proteínas com diversas estruturas e funções, que estão relacionadas com a regulação e coordenação de atividades das células da imunidade inata e adaptativa. As células do sistema imune, em sua totalidade, secretam pelo menos alguma citocina e expressam receptores específicos que atuam na sinalização de para várias citocinas. A nomenclatura das citocinas apresenta uma inconsistência, tendo algumas designadas como interleucinas, seguida por um número, outras que a nomenclatura se baseia na primeira atividade biológica descrita, como no caso do fator de necrose tumoral (TNF) (*tumor necrosis fator*, em inglês)- e interferon. As principais funções das citocinas estão diretamente relacionadas com o crescimento e diferenciação de todas as células do sistema imune, ativação de funções efetoras de fagócitos e linfócitos, além do direcionamento de células imunes para tecidos e regiões afetadas (ABBAS *et al.*, 2015).

A interleucina-4 (IL-4), funciona tanto como um indutor quanto uma citocina de caráter efetor. A IL-4 tem origem principalmente nos linfócitos T CD4+ e os mastócitos ativados, contudo, outras células do tecido também sintetizam essa citocina, que faz parte

da família do tipo I de quatro  $\alpha$ -helicoidal. O receptor da IL-4 constituído por uma cadeia  $\alpha$  de ligação de citocinas, em associação à cadeia  $\gamma_c$  que é compartilhada com outros receptores de citocina. Esse receptor IL-4R $\alpha\gamma_c$ , atua na sinalização por uma via que envolve moléculas como o fator de transcrição STAT6. A proteína STAT6 por sua vez, induz a transcrição de genes que são responsáveis por muitas das ações desta citocina (ABBAS *et al.*, 2015) A IL-4 é uma citocina que tem ação na resposta inflamatória, atuando em diversos contextos da resposta imune (GADANI *et al.*, 2012). As propriedades anti-inflamatórias da IL-4 estão relacionadas com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 e IL-8, uma vez que atua na resposta Th2 promovendo um efeito negativo na síntese das citocinas pró-inflamatórias da via Th1 (figura 2) (ABBAS *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos quais esta citocina atua nos processos inflamatórios presentes na AF ainda permanecem pouco elucidados, no entanto, estudos demonstraram o aumento da expressão dessa molécula em pacientes em estado estável (MAKIS *et al.*, 2000).

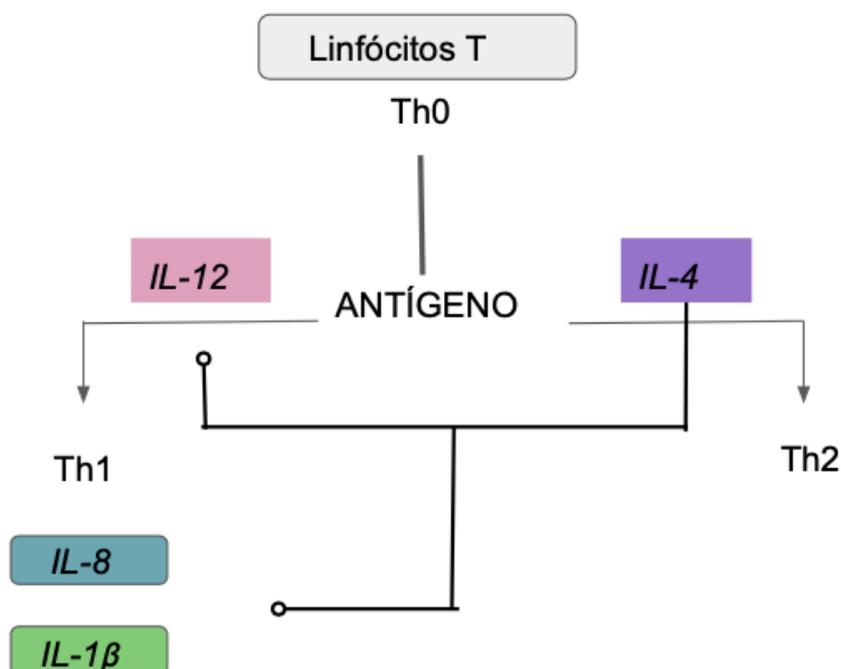


Figura 2. Efeito negativo da IL-4 sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Outra molécula conhecida por interferir na resposta inflamatória é o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), a qual vem sendo reconhecida pelo seu papel em mecanismos inflamatórios de doenças crônicas e autoimunes (PRAVICA *et al.*, 2000). Produzida por principalmente

células T e células NK, e em menor frequência por células B, macrófagos e células dendríticas, o IFN- $\gamma$  tem efeito direto na regulação da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, além de promover o deslocamento de células do sistema imune para o local de inflamação. Com papel importante na diferenciação das células T, essa citocina atua em conjunto com a IL-12 na diferenciação de linfócitos do tipo Th1, além de possuir um efeito inibidor na via de diferenciação dos linfócitos do tipo Th2. A ação pró-inflamatória do IFN- $\gamma$  está direcionada à estimulação da síntese de mediadores inflamatórios, como TNF e o NO em macrófagos (SANVITO *et al.*, 2010). As citocinas IL-12 e IL-18 quando em ação, promove a liberação do IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T e células NK (SCHRODER *et al.*, 2004). Segundo LEE e colaboradores (2017), embora o IFN- $\gamma$  esteja relacionado à resposta imunológica em condições infecciosas essa citocina possui função ligada a processos inflamatórios crônicos e autoimunes, como na artrite reumatoide e o lúpus (MEYER, 2009).

## 2.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM CITOCINAS

Fatores de risco não modificáveis, como idade e sexo masculino, e fatores de risco adquiridos, como hipertensão, tabagismo e diabetes, são responsáveis por grande parte do risco de AVC isquêmico. Contudo, tais fatores permanecem insuficientes para explicar o risco dessa manifestação clínica nos pacientes com AF. Com isso, estudos em gêmeos, famílias e modelos animais, fornecem evidências substanciais relacionadas a contribuição genética para o AVC isquêmico (DICHGANS, 2007).

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) é a mais simples variação genética observada na molécula de DNA, em que a alteração de um único nucleotídeo pode produzir um novo alelo, levando a formação de um fenótipo variante. Acredita-se que em seres humanos, existam aproximadamente 3 milhões de SNP numa frequência de 1 em cada 300 a 1.000 bases nitrogenadas (GRIFFITHS *et al.*, 2016). Os SNPs podem influenciar na expressão de genes a partir da atividade do promotor, na conformação do RNA mensageiro e sua estabilidade, além de alterar proteínas. Dessa forma, os SNPs estão propícios ao desenvolvimento de doenças e disfunções (SHASTRY, 2009).

A presença do polimorfismo -590C/T (rs2243250) no gene da IL-4 (*IL4*) tem sido caracterizada em doenças de caráter inflamatório crônico, como a artrite reumatoide e o

lúpus, sendo associado à gravidade da resposta clínica nessas patologias (HUSSEIN *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2017). A mutação no gene da IL-4 tem sido associada a diminuição nos níveis plasmáticos da molécula (MORENO *et al.*, 2007) e relacionada com alterações nos processos inflamatórios.

Outra molécula conhecida por interferir na resposta inflamatória é o IFN-gama, a qual tem sido reconhecida pelo seu papel em mecanismos inflamatórios de doenças crônicas e autoimunes. O polimorfismo +874 T/A (rs2069705) no gene do INF-gama (*IFNG*) é conhecido por influenciar nos processos inflamatórios, sendo descrito por estar associado à expressão elevada da molécula (PRAVICA *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado que a alteração na resposta anti-inflamatória pode ter efeito significativo nos processos inflamatórios ocorridos no AVC isquêmico.

Deste modo, o presente estudo investigou a presença de polimorfismos nos genes da *IL4* e *IFNG* nos pacientes pediátricos com histórico de AVC, comparando a frequência dos SNPs em um grupo controle. Cumpre ressaltar que a investigação simultânea de vários fatores que influenciam na ocorrência do AVC tem sido realizada como objetivo de descrever possíveis alvos associados à ocorrência da manifestação clínica, bem como contribuir com possíveis informações referentes a futuras estratégias terapêuticas.

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Investigar polimorfismos nos genes das moléculas inflamatórias, como o *IL4* -590C/T (rs2243250) e o *IFNG* +874 T/A (rs2069705), associando-os a parâmetros laboratoriais e à ocorrência do AVC em pacientes pediátricos com a anemia falciforme.

#### OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Realizar as análises hematológicas e bioquímicas em pacientes com AF;
- Investigar a presença dos polimorfismos *IL4* -590C/T (rs2243250) e o *IFNG* +874 T/A (rs2069705);
- Quantificar as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, IL-12 e TNF nos pacientes, associando-os seus níveis séricos com os perfis genéticos e laboratoriais entre os pacientes com e sem histórico de AVC.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Casuística

A casuística foi composta por 66 pacientes com AF, sendo o grupo caso constituído por 24 pacientes com histórico de AVC, que frequentam o ambulatório de *Doppler* Transcraniano da neuropediatra do Centro Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira (CPPHO), do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), CPPHO/HUPES-UFBA. Também foram incluídos no estudo 42 pacientes com AF sem histórico de AVC, compondo o grupo controle, O estudo seguiu as normas de Boas Práticas Clínicas (*Good Clinical Practice* – GCP), os princípios éticos da Declaração de Helsinki e suas revisões e a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo CEP do Complexo Hospitalar da Universidade Federal da Bahia sob no 287.768/2013.

### 4.2 Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo indivíduos que possuíam o perfil de hemoglobinas com o genótipo da AF (HbSS), com idade até 17 anos.

### 4.3 Critérios de exclusão:

Foram excluídos pacientes sem a confirmação do perfil de hemoglobinas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para a AF (HbSS); ou que apresentaram sorologia positiva para HIV, HCV, HTLV I e II e HBV.

### 4.4 Coleta de amostras:

Foram coletados 15 mL de sangue venoso dos participantes, sendo que 5 mL foram coletados em anticoagulante EDTA para as avaliações hematológica e extração de DNA e 10 mL sem aditivos para a separação de soro a ser utilizado nas dosagens bioquímicas e imunológicas. As amostras foram coletadas no CPPHO/HUPES-UFBA e devidamente transportadas para os laboratórios de Análises Clínicas e de Pesquisa em Anemias da LACT-FAR – UFBA, onde foram realizadas as determinações hematológicas e bioquímicas e para o laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional do Instituto

Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-Bahia, onde foram realizadas as análises imunológicas, genéticas, estruturação do banco de dados e análises estatísticas.

#### 4.5 Análises hematológicas:

A confirmação do perfil de hemoglobinas foi obtida pelo método automatizado de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizando o equipamento Variant II - Bio-Rad (Califórnia, USA). Também foi realizado o hemograma em todos os participantes, utilizando-se o contador eletrônico Pentra 80 (HORIBA DIAGNOSTICS, Montpellier, FR). A contagem de reticulócitos foi realizada pela coloração com o azul de cresil brilhante.

#### 4.6 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas incluíram a determinação do perfil lipídico (colesterol total e frações e triglicerídeos), albumina, proteínas totais e frações, bilirrubinas total e frações, desidrogenase láctica (LDH), transaminases (ALT e AST), perfil renal (uréia e creatinina) e ferro, sendo que estas foram realizadas pelo método automatizado utilizando o A25 (BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain). A dosagem de ferritina foi realizada no Access 2 (Beckman Coulter Inc, CA, EUA) e as determinações de proteína C reativa, alfa 1 antitripsina, e antiestreptolisina O (ASLO) foram realizadas no Immage (Beckman Coulter Inc, CA, EUA).

#### 4.7 Análises genéticas

Cerca de 200uL de sangue periférico foram usados para extrair o DNA genômico dos leucócitos por meio do QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN, EUA), de acordo com as recomendações do laboratório. A concentração e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas no NanoDrop ND-1000 (ISOGEN LIFE SCIENCE, De Meem, Holanda). O polimorfismo no gene da *IL4* -590 C> T (rs2243250) foi investigado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). A região de interesse foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os seguintes *primers*: 5'-TAAACTTGGGGAGAACATGGT-3' e 5'TGGGGAAAAGATAGAGTAATA-3', para a investigação do polimorfismo no gene *IL4*. O polimorfismo *IFNG* +874 T>A (rs2069705) foi investigado por PCR alelo específica, usando dois *primers* de sentido; 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3' (*primer* A) e 5'-

TTCTTACAACACAAAATCAAATCT-3' (*primer T*) e um primer comum *reverse* 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'.

#### 4.8 Dosagem de citocinas

As concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, IL-12 e TNF foram investigadas por imunoensaio baseado em partículas usando o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation Kit (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A população de esferas foi obtida em um bioanalisador BD FACSAArray™ (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) e o Software FlowJo, LLC (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA) foi usado para analisar os dados.

#### 4.9 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) v. 20.0 (IBM, Armonk, Nova York, EUA) e *GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Foram utilizados os testes ANOVA, Kruskal Wallis,  $\chi^2$  e exato de Fisher. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado para cada SNP pela calculadora do programa on-line da *Tufts University*, EUA ([www.tufts.edu](http://www.tufts.edu)). Aqueles com associação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparados às frequências esperadas para cada genótipo, foram admitidos como fora do equilíbrio.

## 5. RESULTADOS

### Características basais

As características basais de crianças com AF com história prévia de AVC e do grupo controle, incluindo a média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos dados laboratoriais, foram apresentadas na Tabela 1.

### Perfil hematológicos e bioquímicos dos pacientes

A comparação entre os perfis hematológicos e bioquímicos entre o grupo com histórico de AVC e o grupo controle mostrou que os indivíduos com AVC apresentaram diminuição nos níveis de albumina ( $p = 0,006$ ), ácido úrico ( $p = 0,0395$ ) e proteínas totais ( $p = 0,0087$ ), bem como o aumento na contagem de reticulócitos ( $p = 0,0101$ ) (Figura 2).

### Frequências genotípicas

A partir das análises dos dados genéticos desta amostra, foi identificado que as frequências genotípicas dos polimorfismos (Tabela 2) não se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### Associações entre polimorfismos nos genes *IFNG* e *IL4* e parâmetros laboratoriais em pacientes com AF

Pacientes com a presença do alelo variante T no gene *IL4* tiveram contagem aumentada de linfócitos ( $p = 0,0152$ ) e plaquetas ( $p = 0,0203$ ), além de PCT ( $p = 0,0227$ ), bilirrubina direta ( $p = 0,0054$ ), níveis IL1- $\beta$  ( $p = 0,0300$ ), IL-8 ( $p = 0,0167$ ) e IL-12 ( $p = 0,0095$ ) (Figura 3). Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença de polimorfismo no gene do *IFNG* e os parâmetros laboratoriais avaliados neste estudo.

### Associação entre polimorfismos nos genes *IFNG* e *IL4* e parâmetros laboratoriais no grupo com AVC

No grupo pediátrico com histórico prévia de AVC o alelo variante T do polimorfismo -590 C> T no gene *IL4* esteve associado ao aumento nos valores de RDW ( $p = 0,0105$ ),

LDL-C ( $p = 0,0351$ ), AST ( $p = 0,0292$ ), bilirrubina total ( $p = 0,0468$ ) e níveis de bilirrubina indireta ( $p = 0,0351$ ), bem como na diminuição dos níveis de MCV ( $p = 0,0105$ ) e MCH ( $p = 0,0421$ ) (Figura 4). Não foi encontrada associação estatística entre a presença de polimorfismo no gene do *IFNG* e os parâmetros laboratoriais no grupo com AVC.

**Tabela 1.** Características bases em pacientes com AF, incluindo dados hematológicos, bioquímicos e inflamatórios.

	<b>Caso</b>		<b>Controle</b>	
	<b>N</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>N</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>Gênero</b>				
Feminino	14		17	
Masculino	10		25	
<b>Idade (Anos)</b>	24	13,29 ± 4,5		14,64 ± 3,7
<b>Parâmetros laboratoriais</b>				
<b>Hematológicos</b>				
RBC, x10 <sup>6</sup> /L		2,84 ± 0,52		3,02 ± 0,85
Hemoglobina, g/dL		9,04 ± 1,26		9,11 ± 1,80
Hematócrito, %		26,35 ± 3,89		26,94 ± 5,60
MCV, fL		93,74 ± 11,35		90,81 ± 10,47
MCH, pg		32,03 ± 4,26		30,79 ± 3,49
MCHC, g/dL		34,14 ± 1,51		33,92 ± 1,04
RDW (%)		20,9 ± 3,17		21,60 ± 4,48
Contagem de reticulócitos (%)		6,48 ± 2,79		4,37 ± 2,12
Bilirrubina total, mg/dL		2,49 ± 1,92		2,89 ± 1,77
Bilirrubina direta, mg/dL		0,40 ± 0,18		0,4 ± 0,17
Bilirrubina indireta, mg/dL		2,09 ± 1,84		2,49 ± 1,72
LDH, U/L		1158,04 ± 519,04		1042,14 ± 441,04
<b>Leucócitos</b>				
WBC (/mL)		12054,58 ± 3567,43		10716,66 ± 3250,58
Neutrófilos (/mL)		6198,29 ± 2444,98		5308,09 ± 2403,72
Eosinófilos (/mL)		371,33 ± 309,17		417 ± 339,74
Linfócitos (/mL)		4278,75 ± 1611,37		3856,92 ± 1694,02
Monócitos (/mL)		1020,16 ± 493,18		1007,83 ± 476,06
<b>Plaquetas</b>				
Contag. de plaquetas, x10 <sup>3</sup> /mL		392,83 ± 133,80		399,16 ± 152,02
Média vol. de plaquetas, fL		7,7 ± 1,25		7,92 ± 0,85
PCT (%)		0,30 ± 0,11		0,31 ± 0,13
<b>Glicose</b>				
Glicose, mg/dL		80,00 ± 7,96		83,07 ± 7,91
<b>Metabolismo de lipídios</b>				
Colesterol total, mg/dL		135,82 ± 41,31		124,26 ± 25,83
Triglicerídeos, mg/dL		129,04 ± 98,19		109,23 ± 35,26

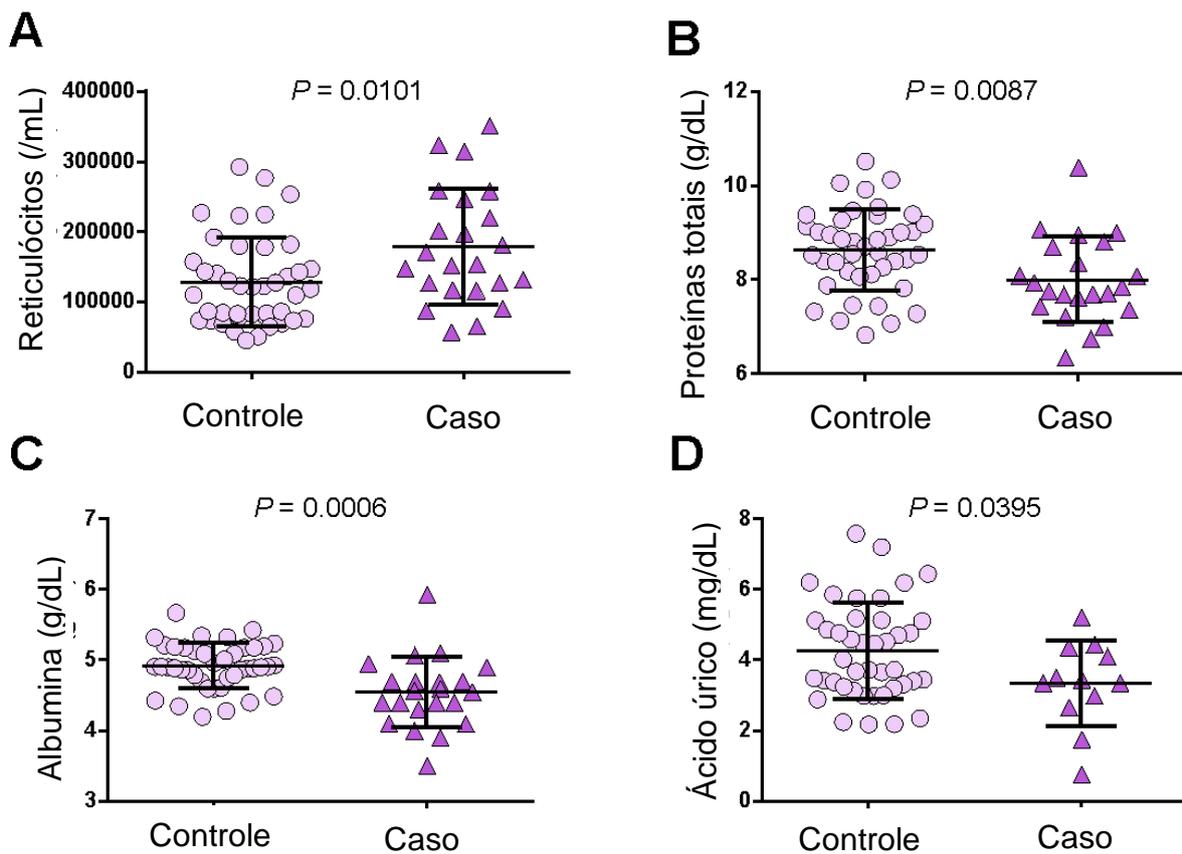
HDL-C, mg/dL	33,82 ± 12,28	37,04 ± 8,48
LDL-C, mg/dL	71,70 ± 20,80	63,19 ± 22,04
VLDL-C, mg/dL	22,56 ± 12,25	23,66 ± 10,9
<b>Fígado</b>		
ALT, U/L	21,47 ± 17,73	19,57 ± 14,19
AST, U/L	43,95 ± 20,10	42,78 ± 18,54
Proteína total, g/dL	8,0 ± 0,88	8,62 ± 0,87
Albumina, g/dL	4,51 ± 0,511	4,91 ± 0,32
Globulina, g/dL	3,48 ± 0,66	3,71 ± 0,78
<b>Rim</b>		
Nitrogênio da ureia, mg/dL	20,35 ± 8,14	17,48 ± 7,50
Creatinina, mg/dL	0,46 ± 0,15	0,51 ± 0,19
<b>Inflamação</b>		
IL-8, pg/mL	5,16 ± 3,22	4,06 ± 2,55
IL-1 $\beta$ , pg/mL	10,00 ± 4,34	8,38 ± 5,49
IL-6, pg/mL	14,69 ± 1,99	14,31 ± 3,46
IL-10, pg/mL	12,18 ± 1,20	12,21 ± 2,94
TNF, pg/mL	3,30 ± 1,47	3,45 ± 1,95
IL-12, pg/mL	8,04 ± 3,71	10,40 ± 15,64

---

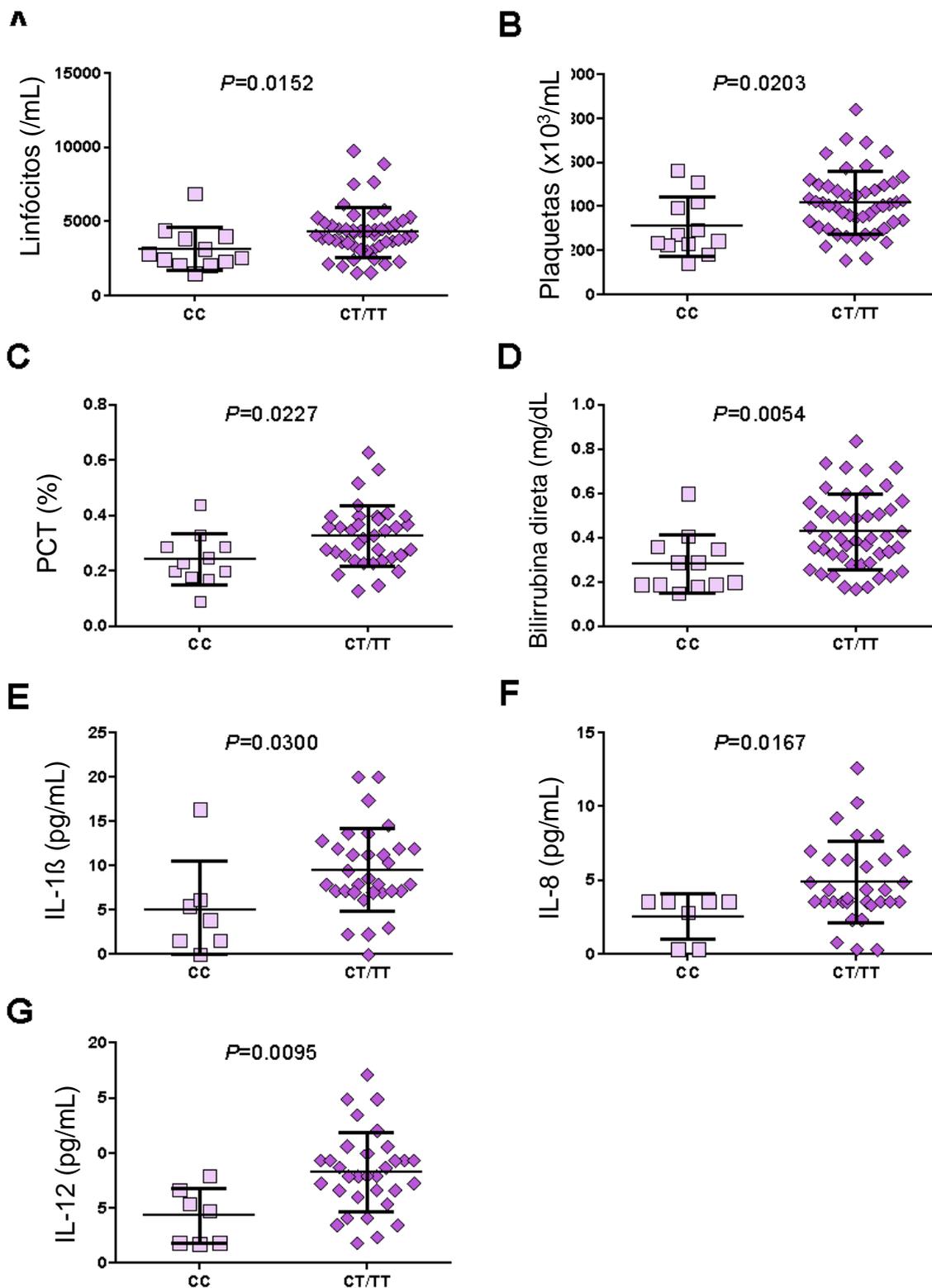
RBC: glóbulos vermelhos; MCV: volume celular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular; RDW: largura de distribuição dos glóbulos vermelhos; LDH: lactato desidrogenase; WBC: glóbulo branco; VPM: volume plaquetário médio; PCT: plaquetas; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol de lipoproteína de densidade muito baixa; AST: aspartato amino-transferase; ALT: alanina amino-transferase; IL-8: interleucina-8; IL-1 $\beta$ : interleucina-1 beta; IL-6: interleucina-6; IL-10: interleucina-10; IL12: interleucina-12, TNF: fator de necrose tumoral.

**Tabela 2.** Frequências dos polimorfismos entre o grupo caso e o grupo controle.

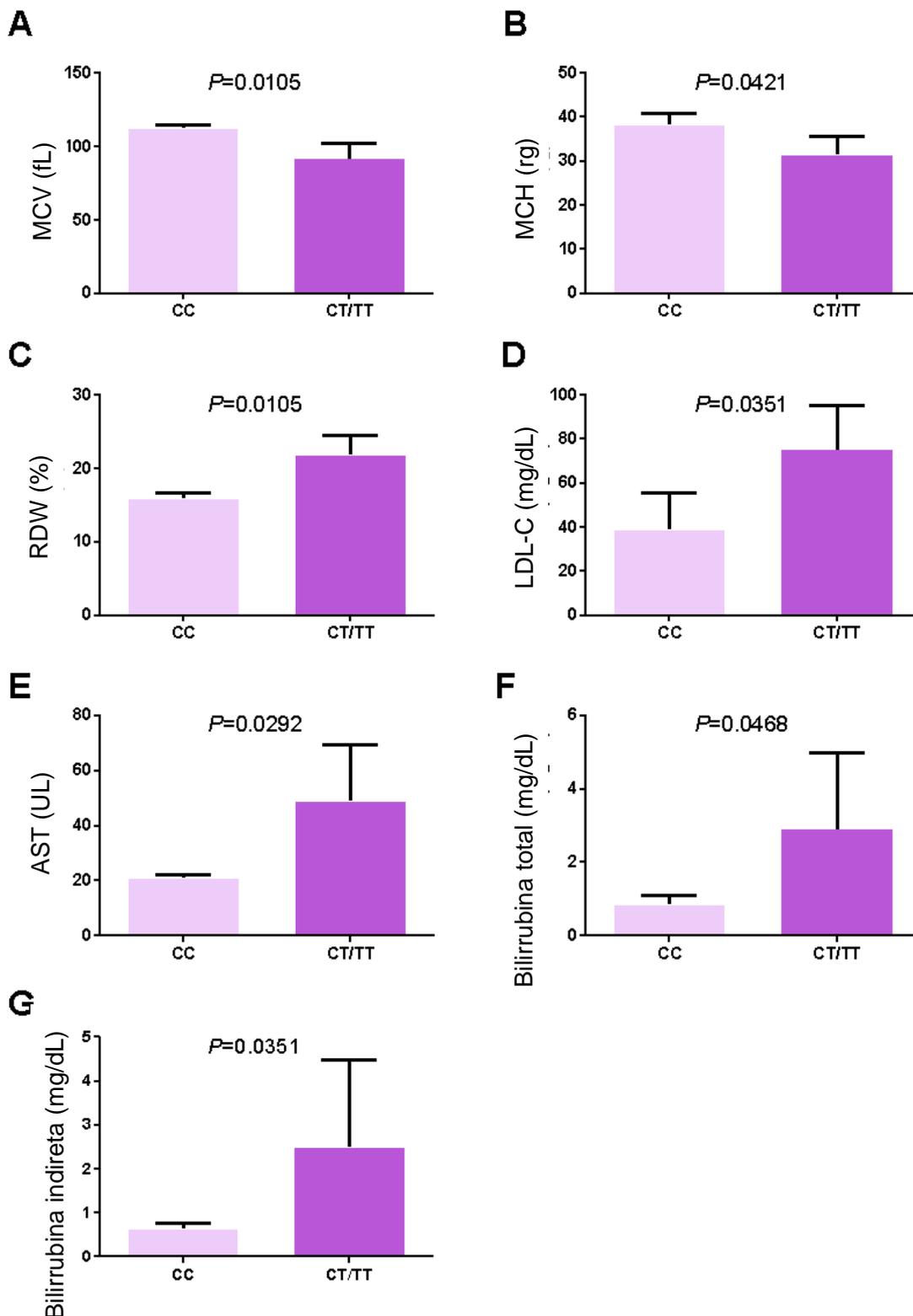
Polimorfismo	Genótipo	Frequências Genotípicas	
		Caso (%)	Controle (%)
<b><i>IFNG +874 T&gt;A</i></b>	TT	5,00 (1/20)	40,47 (17/42)
	TA	40,00 (8/20)	11,90 (5/42)
	AA	55,00 (12/20)	47,6 (20/42)
<b><i>IL4 -590 C&gt;T</i></b>	CC	15,00 (3/20)	25,00 (10/40)
	CT	60,00 (12/20)	62,50 (25/40)
	TT	25,00 (5/20)	12,50 (5/40)



**Figura 3.** Associação dos dados laboratoriais com a ocorrência de AVC. Crianças com história prévia de acidente vascular cerebral exibiram: A) aumento da contagem de reticulócitos (valor p obtido por Mann Whitney), B) diminuição nos níveis de proteínas totais (valor p obtido pelo teste t), C) diminuição nos níveis de albumina (valor p obtido pelo teste t teste) e D) diminuição nos níveis de ácido úrico. O valor de p foi calculado pelo teste t.



**Figura 4.** Associação entre dados laboratoriais e o polimorfismo -590 C>T *IL4*. Crianças com AF portadoras do genótipo CT / TT exibiram A) aumento de linfócitos e B) contagem de plaquetas, além de C) aumento do plaquetócrito. Esses pacientes também exibiam D) aumento da bilirrubina direta, E) aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ , F) IL-8 e G) IL-12. O valor de p foi calculado pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 5.** Associação entre dados laboratoriais e o polimorfismo -590 C>T *IL4* no grupo caso. Crianças com AF com história prévia de AVC e portadores do genótipo CT / TT apresentaram A) diminuição nas concentrações de MCV e B) de MCH, bem como C) na de RDW. Além disso, esses pacientes também exibiam D) níveis aumentados de LDL-C, E) AST, F) bilirrubina total e G) bilirrubina indireta. Valor de p foi calculado pelo teste U de Mann-Whitney.

## 6. DISCUSSÃO

Um das manifestações clínicas mais graves e com consequências debilitantes na anemia falciforme, é o AVC, sendo bastante comum entre indivíduos com o alelo beta S em homozigose, contudo, a fisiopatologia do desenvolvimento dessa manifestação permanece pouco elucidadas. Estudos sugerem uma condição multifatorial para a ocorrência do AVC na AF (SILVA *et al.*, 2011; SWITZER *et al.*, 2006). Neste cenário, estudos clássicos demonstram que marcadores laboratoriais têm tido papéis importantes para identificar possíveis riscos de ocorrência do AVC em indivíduos com AF, visto que há relações entre a contagem elevada de reticulócitos e eventos de AVC (ADAMS *et al.*, 1994; BERNAUDIN *et al.*, 2011; PAVLAKIS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

Um dos fatores que contribuem para o desencadeamento de crises vaso-oclusiva é a presença de moléculas de adesão na membrana dos reticulócitos, os precursores dos eritrócitos. (KATO *et al.*, 2007). A adesão de reticulócitos ao endotélio vascular estimula diversos processos inflamatórios, o que tem sido considerado como o ponto de ligação entre a hemólise e a vaso-oclusão (KATO *et al.*, 2017). Devemos considerar que a relação entre a hemólise e a ocorrência do AVC ainda não está bem estabelecida na fisiopatologia da AF, todavia, estudos indicam para a relação direta entre o quadro hemolítico e o risco de AVC em pacientes pediátricos com a doença (BELISÁRIO *et al.*, 2018; CONNES *et al.*, 2013).

Foi encontrado no presente estudo, uma contagem elevada de reticulócitos em pacientes pediátricos com histórico prévio de AVC, o que indica uma associação significativa para a ocorrência dessa manifestação clínica. Diversos estudos na literatura vêm relatado essa associação que tem sendo confirmada a cada estudo sequente. (ADAMS *et al.*, 1997; PAVLAKIS *et al.*, 2010; BERNAUDIN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011). Dentre os marcadores laboratoriais, a contagem de reticulócitos é considerada por diversos autores como o mais importante marcador laboratorial associado ao risco do desenvolvimento de um AVC (BERNAUDIN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; MEIER *et al.*, 2014; BELISÁRIO *et al.*, 2016;). Dessa forma, nossos resultados para a contagem elevada de reticulócitos, sugerem os indivíduos com histórico de AVC, possuíam um quadro hemolítico mais exacerbado, o que contribui diretamente para os processos inflamatórios crônicos e para o desencadeamento da vaso-oclusão, uma vez que o aumento da anemia

hemolítica crônica é uma das consequências do aumento da contagem de reticulócitos na circulação sanguínea (KATO *et al.*, 2007)

A transfusão de hemocomponentes é uma terapia utilizada para reduzir aspectos clínicos dos pacientes com AF, reduzindo os riscos do paciente vir a desenvolver um AVC, uma vez que reduz a hemólise intravascular e conseqüentemente, diminui a ocorrência de vasculopatia e obstrução dos vasos sanguíneos. (KATO *et al.*, 2007; LEZCANO *et al.*, 2006). Nossos resultados para marcadores hematológicos como hemoglobina e hematócrito foi encontrados elevados em pacientes com histórico de AVC, não é característico para esse grupo (HOPPE *et al.*, 2004), o que sugere que a transfusão de hemocomponentes pode ter alterado o perfil hematológico desses pacientes. (COHEN *et al.*, 1992; VERDUZCO & NATHAN, 2009).

A polimerização da HbS no contexto da AF é a origem de toda fisiopatologia da doença, uma vez que a mesma promove a ocorrência da hemólise e conseqüentemente toda a cadeia que leva a vaso-oclusão, contribuindo para o quadro inflamatório crônico nos pacientes. Nesse contexto, o quadro hemolítico crônico possui implicações patológicas importantes, por conta da liberação intravascular de hemoglobina e arginase, o que provoca a biodisponibilidade e NO, contribuindo a vaso-oclusão e estado inflamatório crônico, levando ao aparecimento de manifestações clínicas (CONRAN & BELCHER, 2018; BELISARIO *et al.*, 2016; SAEED *et al.*, 2007).

Podemos associar o processo vaso-oclusivo, que desencadeia a obstrução vascular no AVC, com a expressão de moléculas inflamatórias, visto que, esses mediadores contribuem para a formação de agregados celulares que irão obstruir o fluxo sanguíneo cerebral, devido a resposta exacerbada ao dano endotelial (BELISÁRIO *et al.*, 2018). A partir de estudos que investigam amplamente as alterações no perfil inflamatório, foi possível elucidar uma associação entre o fenômeno da inflamação com a ocorrência de AVC isquêmico em pacientes com AF (MUIR *et al.*, 2007). Podemos comparar essas associações com outras condições inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide, a qual estudos sugerem que a inflamação é um fator que contribui significativamente para o desenvolvimento do AVC (EMSLEY & TYRRELL, 2002; MARADIT-KREMERS *et al.*, 2005; SOLOMON *et al.*, 2006). Em contrapartida, pacientes com artrite reumatoide que foram tratados com terapia anti-inflamatórias, como o bloqueio de TNF, apresentaram um risco reduzido para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o que evidencia o papel

dos processos inflamatórios na obstrução vascular (BEK *et al.*, 2017; DHILLON & LIANG, 2015; WOLFE & MICHAUD, 2004).

Para Smith & Humphries (2009), os variados níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias podem ser influenciados por fatores genéticos e ambientais. Sendo que as alterações genéticas podem provocar uma modificação estrutural das proteínas ou alterar os níveis de expressão das citocinas, podendo interferir na resposta inflamatória.

Genes específicos podem funcionar como precursores para o desenvolvimento do AVC no cenário da AF, principalmente genes que estão relacionados com a trombose, a inflamação e adesão celular (HOPPE *et al.*, 2004; VOETSCH *et al.*, 2007).

Contagem de linfócitos e plaquetas, bem como níveis de proteínas totais e bilirrubina direta, além de níveis elevados de citocinas inflamatórias como IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-8 foram encontradas nesse presente estudo em associação com os pacientes portadores do alelo mutante T do gene *IL4*, o que sugere que esse polimorfismo tem efeito no estado pró-inflamatório. A IL-4 tem atuação em diversas funções biológicas com papel bem descrito na via de diferenciação de células do tipo Th2, com papel importante nas respostas infecções parasitárias e reações alérgicas (CHIES & NARDI, 2001; ZAMORANO *et al.*, 2003). Segundo WEI e colaboradores (2017), a IL-4 pode apresentar um efeito anti-inflamatório, interferindo na expressão de moléculas pró-inflamatórias do perfil Th1. Na AF, a presença de níveis mais elevados de citocinas do perfil Th2 tem sido associada a indivíduos em estado estável, mas os efeitos dessas citocinas na fisiopatologia da AF ainda não foram elucidados (PATHARE *et al.*, 2004; RAGHUPATHY *et al.*, 2000).

Nesse trabalho, foi encontrado um resultado que sugere que o alelo mutante T diminui a expressão dessa citocina de caráter anti-inflamatório, promovendo então, o acontecimento de eventos pro-inflamatórios, uma vez que, a IL-4 tem papel importante interferindo na via de diferenciação Th1, a qual é responsável pelo aparecimento intravascular de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-8 (ABBAS *et al.*, 2015). Ou seja, os baixos níveis de IL-4 em decorrência do alelo mutante T, condiciona essa citocina a um efeito pro-inflamatório. Em indivíduos com artrite reumatoide por exemplo, 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). Porém, outros estudos descrevem níveis mais elevados dessa citocina na presença do alelo T (TANGTEERAWATANA *et al.*, 2007). Dessa forma, é necessário compreender a atuação genética desse polimorfismo no gene, além de considerar outros fatores genéticos e ambientais que podem levar a essa

divergência. Isso evidencia que os polimorfismos podem se comportar de forma diferentes nas populações, principalmente quando associados a heranças étnicas, que podem influenciar na expressão (HOFFMANN *et al.*, 2007).

Considerando o grupo com histórico prévio de AVC, foi encontrada neste estudo uma associação entre a presença do alelo T e os baixos níveis de marcadores laboratoriais como VCM e HCM, que nesse contexto, quando em baixos níveis, são indicadores de anemia microcítica (SILVA *et al.*, 2001). Observou-se também uma associação entre os valores de RDW, LDL, AST, bilirrubina total e indireta, com valores mais elevados em pacientes portadores do alelo T. Esses marcadores são importantes indicadores para a gravidade da doença, em que o seu aumento reflete num quadro clínico agravado. Dados da literatura descrevem que a presença do alelo T na artrite reumatoide é mais frequente em indivíduos com a forma ativa da doença (PAWLIK *et al.*, 2005), sugerindo então que o polimorfismo pode contribuir para o um estado pró-inflamatório.

Considerando a população estudada, o alelo mutante no gene *IFNG* foi encontrado em maior frequência, uma evidência que é corroborada pela literatura, em que o alelo mutante é mais frequente que o selvagem em outras populações (GHASEMIAN & SHAHBAZI, 2016; PAVLAKIS *et al.*, 2010). Em relação a ocorrência do AVC, não foram encontradas associações estatisticamente significantes na presença do alelo mutante A na população estudada. O efeito do polimorfismo *IFNG* +874 T>A na expressão gênica é controverso, alguns estudos apontam que os diferentes genótipos podem influenciar a expressão, com o genótipo TT estando associado a níveis mais elevados de expressão gênica, o TA com expressão média e o AA com baixos níveis de expressão (AL-MOHAYA *et al.*, 2016). Em contraponto, outros estudos sugerem uma associação dos polimorfismos com o desenvolvimento de doenças autoimunes, contudo, não confirmam tal associação (LEE & BAE, 2016). Dentro dessa perspectiva, outras variáveis genéticas podem interferir sobre o efeito do SNP, o que promove uma plasticidade de efeitos em diferentes populações, principalmente considerando os grupos étnicos (HOFFMANN *et al.*, 2002)

No que se diz a respeito das frequências genóticas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi identificado que as frequências polimórficas dos genes do *IFNG* e *IL4* não se encontram em equilíbrio. Uma das premissas para o modelo do equilíbrio de Hardy-Weinberg é de que as populações sejam infinitamente grandes, o que não fez parte desse estudo, uma vez que o *N* amostral foi menor do que 1000 indivíduos, dessa forma, o resultado encontrado

possui efeito preliminar, sendo necessário a investigação em um N amostral mais robusto (WIGGINTON *et al.*, 2005).

O presente estudo possui um número limitado de indivíduos, e por conta disso, nossos resultados possuem um efeito preliminar, sendo então necessário futuros estudos com um número amostral maior, para que se possa confirmar os achados atuais.

## 7. CONCLUSÃO

Através do presente estudo foi possível descrever que os indivíduos HbSS com histórico prévio de AVC apresentaram alterações nos parâmetros laboratoriais, tais como contagem de reticulócitos, dosagem de proteínas totais, albumina e ácido úrico, sugerindo que estes como possíveis biomarcadores associados ao evento. Em contrapartida, o polimorfismo +874 na região promotora no gene do *IFNG* não foi associado com a ocorrência de AVC na população estudada, sendo o alelo mutante no gene do *IFNG* mais frequente que o alelo selvagem, uma frequência que corrobora outros estudos da literatura. O polimorfismo IL4 - 590 C>T apresentou uma associação estatisticamente significativa com alterações nos parâmetros laboratoriais, como RDW, LDL, AST, bilirrubina total e bilirrubina indireta, sugerindo um efeito positivo para gravidade da doença. Ainda assim, o alelo mutante T no gene *IL4*, esteve associado com níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias como IL-8, IL-1 $\beta$  e IL-12, indicando que o polimorfismo pode estar contribuindo para o aumento do estado pro-inflamatório. Dessa forma, conclui-se que o estudo de múltiplas variáveis genéticas simultâneas pode contribuir para o esclarecimento desses fatores na ocorrência do AVC, tendo em vista que essa manifestação clínica possui um caráter multifatorial.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K et al. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier, 8<sup>a</sup> ed. 2015.
- ADAMS, R. J. Big strokes in small persons. **Archives of neurology**, v. 64, n. 11, p. 1567–1574, nov. 2007.
- 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, 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, Robert J. et al. Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. **American journal of hematology**, v. 45, n. 4, p. 279-282, 1994.
- ADAMS, Robert J. TCD in sickle cell disease: an important and useful test. **Pediatric radiology**, v. 35, n. 3, p. 229-234, 2005.
- AL-KHOLY, Wfaa et al. TNF- $\alpha$ - 308 G> A and IFN- $\gamma$ + 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- $\gamma$ , interleukin-6 and transforming growth factor- $\beta$ 1 gene with oral lichen planus susceptibility. **BMC oral health**, v. 16, n. 1, p. 76, 20 ago. 2016.
- ASARE, Kwaku et al. Plasma interleukin-1 $\beta$  concentration is associated with stroke in sickle cell disease. **Cytokine**, v. 49, n. 1, p. 39-44, 2010.
- AZEVEDO, E. S.; ALVES, A. F. P.; SILVA, M. C. B. O.; SOUZA, M. G. F.; LIMA, A. M. V. M. D.; AZEVEDO, W. C. **Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil**. *Am. J. Phys. Anthropol.*, v. 53, p. 509-512, 1980.
- 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.
- BALLAS, Samir K. The cost of health care for patients with sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 84, n. 6, p. 320-322, 2009.
- BEK, S. et al. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. **The pharmacogenomics journal**, v. 17, n. 5, p. 403–411, out. 2017.
- 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.
- BELISÁRIO, André Rolim et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Brazilian Children With Sickle Cell Anemia is not Associated With Clinical Ischemic Stroke

or High-Risk Transcranial Doppler. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 63, n. 6, p. 1046-1049, 2016.

BERNAUDIN, Françoise 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. 1130-1140, 2011.

BOKHARI, Faraz Ahmed et al. TNF-alpha: a risk factor for ischemic stroke. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 26, n. 2, p. 111-114, 2014.

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: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

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.

Campbell, N.A.; Reece, J.B.; Urry, L.A.; Cain, M.L.; Wasserman, S.A.; Minorsky, P.V. & Jackson, R.B. 2010. **Biologia**. 8a. ed. Artmed, Porto Alegre, 1464 p.

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.

CHIES, J. A. B.; NARDI, N. B. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Medical hypotheses**, v. 57, n. 1, p. 46-50, 2001.

COHEN, Alan R. et al. A modified transfusion program for prevention of stroke in sickle cell disease. 1992.

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

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

DeBaun MR, Gordon M, McKinstry RC, Noetzel MJ, White DA, Sarnaik SA, et al.. Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. **N Engl J Med**. 2014

DeBaun, Michael R.; KIRKHAM, Fenella J. Central nervous system complications and management in sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 829-838, 2016.

DHILLON, N.; LIANG, K. Prevention of stroke in rheumatoid arthritis. **Current treatment options in neurology**, v. 17, n. 7, p. 356, jul. 2015.

DI NAPOLI, M., PAPA, F., BOCOLA, V. **C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor**. *Stroke*. 2001 4:917-24.

DICHGANS, Martin; HEGELE, Robert A. Update on the genetics of stroke and cerebrovascular disease 2006. **Stroke**, v. 38, n. 2, p. 216-218, 2007.

DICHGANS, Martin. Genetics of ischaemic stroke. **The Lancet Neurology**, v. 6, n. 2, p. 149-161, 2007.

E TSOUMANI, Maria et al. Platelet-mediated inflammation in cardiovascular disease. Potential role of platelet-endothelium interactions. **Current vascular pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 539-549, 2012.

EDWARDS, A. W. F. GH Hardy (1908) and hardy–weinberg equilibrium. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1143-1150, 2008.

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, Hedley CA; TYRRELL, Pippa J. Inflammation and infection in clinical stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, n. 12, p. 1399-1419, 2002.  
FAROOQ, S.; TESTAI, F. D. Neurologic Complications of Sickle Cell Disease. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 19, n. 4, p. 17, 2019.

FASSENBENDER K., ROSSOL S., KAMMER T. et al., **Pro-inflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relations to the extent of brain damage and outcome of disease**. J. Neurol. Sci., 1994; 222: 135–139.

FULLERTON, Heather J. et al. Deaths from stroke in US children, 1979 to 1998. **Neurology**, v. 59, n. 1, p. 34-39, 2002.

FULLERTON, Heather J. et al. Risk of stroke in children: ethnic and gender disparities. **Neurology**, v. 61, n. 2, p. 189-194, 2003.

GABAY, Cem; LAMACCHIA, Céline; PALMER, Gaby. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 4, p. 232, 2010.

GADANI, S. P. et al. **IL-4 in the brain: a cytokine to remember**. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 9, p. 4213–4219, 1 nov. 2012.

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.

GHASEMIAN, Nadia; SHAHBAZI, Majid. 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, 2016.

HAJEER, Ali H.; HUTCHINSON, Ian V. Influence of TNF $\alpha$  gene polymorphisms on TNF $\alpha$  production and disease. **Human immunology**, v. 62, n. 11, p. 1191-1199, 2001.

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.

HOPPE, C., KLITZ, W., CHENG, S., APPLE, R., STEINER, L., ROBLES, L., GIRARD, T. VICHINSKY, E., STYLES, L. **Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia**. *Blood*. 2004;103:2391-2396

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.

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.

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.

KHOSHNAMEH, Seyed Esmail et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. **Neurological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 1167-1186, 2017.

KIM, I. Y. et al. The Role of Uric Acid in Kidney Fibrosis: Experimental Evidences for the Causal Relationship. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 638732, 2014.

KROEGER, Karen M.; CARVILLE, Kylie S.; ABRAHAM, Lawrence J. The- 308 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription. **Molecular immunology**, v. 34, n. 5, p. 391-399, 1997.

LEE, Young Ho; BAE, Sang Cheol. Association between interferon- $\gamma$ + 874 T/A polymorphism and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **Lupus**, v. 25, n. 7, p. 710-718, 2016.

LEZCANO, Nelson 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, 2006.

LINDSBERG, P. J.; GRAU, A. J. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. **Stroke**, v. 34, n. 10, p. 2518–2532, 2003.

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.

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, Hilal et al. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 3, p. 722-732, 2005.

MEIER, Emily Riehm; WRIGHT, Elizabeth C.; MILLER, Jeffery 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, 2014.

MEYER, Olivier. Interferons and autoimmune disorders. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 5, p. 464-473, 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.

OHENE-FREMPONG K, WEINER SJ, SLEEPER LA, et al. **Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors**. *Blood*. 1998;91: 288-294.

OHENE-FREMPONG, Kwaku et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 288-294, 1998.

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

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. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **American Journal of Hematology**, v. 77, n. 4, p. 323–328, 1 dez. 2004.

PAVLAKIS, Steven 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, 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.

POTOKA, Karin P.; GLADWIN, Mark T. Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 4, p. L314-L324, 2015.

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.

PROENÇA-FERREIRA, Renata et al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89012, 2014.

RAGHUPATHY, R. et al. Th1 and Th2 cytokine profiles in sickle cell disease. **Acta haematologica**, v. 103, n. 4, p. 197-202, 2000.

RODGERS, Griffin P. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell anemia. In: **Seminars in hematology**. 1997. p. 2.

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, 2005.

SANVITO, Lara et al. The multifaceted role of interferon- $\gamma$  in central nervous system autoimmune demyelination. **The Open Autoimmunity Journal**, v. 2, n. 1, 2010.

SCHRODER, Kate et al. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

SILVA, Célia Maria; GIOVANI, Poliana; VIANA, Marcos Borato. 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, 2011.

SILVA, Nadia Marques da et al. Influencia da talassemia [alfa]<sup>+</sup> nos indices hematimetricos VCM e HCM e nos percentuais de Hb anomala em portadores da Hb C. 2001.

SMITH, Andrew JP; HUMPHRIES, Steve E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 1, p. 43-59, 2009.

SOLOMON, Lawrence R. Pain management in adults with sickle cell disease in a medical center emergency department. **Journal of the National Medical Association**, v. 102, n. 11, p. 1025-1032, 2010.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 5, p. ITC3-1, 6 set. 2011.

STEINBERG, Martin H. Sickle cell disease. **Annals of internal medicine**, v. 155, n. 5, p. ITC3-1, 2011.

SWITZER, Jeffrey 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, 2006.

TANGTEERAWATANA, Piyatida 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, 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. [s.l: s.n.]. v. 12

VERDUZCO, Luis A.; NATHAN, David G. Sickle cell disease and stroke. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 114, n. 25, p. 5117-5125, 2009.

VOETSCH, Barbara 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, 2007.

WAGENER, Frank ADTG et al. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 2, p. 52-54, 2001.

WANG, Sijia et al. Genetic variation and population structure in Native Americans. **PLoS Genet**, v. 3, n. 11, p. e185, 2007.

WARE, Russell E. et al. Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311-323, 2017.

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.

WIGGINTON, Janis E.; CUTLER, David J.; ABECASIS, Gonçalo R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. **The American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 5, p. 887-893, 2005.

WOLFE, F.; MICHAUD, K. Heart failure in rheumatoid arthritis: rates, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy. **The American journal of medicine**, v. 116, n. 5, p. 305–311, mar. 2004.

ZAMORANO, J.; RIVAS, M. D.; PEREZ, G. M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. **Inmunologia**, v. 22, p. 215-24, 2003.

## ANEXOS

### A - 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-oclusão.

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).

## B - 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: {GENDER} ( ) 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<sup>+</sup>[3] ( ) SB<sub>0</sub>[4] ( ) SD[5]

13. Haplótipo {HAPL} ( ) Sen[0] ( ) Car[1] ( ) Ben[2] ( ) Cam[3] ( ) San-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]

- Qual especialidade? {ESPEC}       Cardiologia [0]       Oftalmologia [1]       Neurologia [2]  
 Infectologia [3]       Pneumologia [4]       Cirurgia [5]  
 Angiologia [6]       Nefrologia [7]       Clínica da Dor [8]  
 Outras [9]
16. Já teve pneumonia? {PNEU}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes? {QPNEU}       1[0]       2-3[1]       4-6[2]       7 ou + [3]  
 Se SIM, teve febre? {FEBRE}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Anormalidade no RX? {ARX}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Quando internado, usou medicação? {MPNEU}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Quais? {DESCMPNEU}
- 
17. Teve ou tem esplenomegalia? {ESPLE}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Em que período? {PERIOESPLE}       <6m [0]       6m-1ano [1]       2-3a [2]       4-5a [3]       >6a [4]  
 Teve crise de seqüestro esplênico? {SEQESPLE}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes? {QSEQESPLE}
- 
18. Faz uso profilático de Penicilina? {PROP}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Se SIM, qual? {QPEN}       Penicilina V oral [0]       Penicilina benzatina [1]  
 Se Sim, há quanto tempo? {QTPEN}       até 1 ano [0]       + de 1 ano a 3 anos [1]  
 + 3 anos a 5 anos [2]       + 5 anos a 7 anos [3]  
 + de 7 anos [4]
19. Já teve AVC? {AVC}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes? {QAVC}       1 [0]       2 [1]       3 [2]       4 ou + [3]  
 Se SIM, seqüelas do AVC? {SEQAVC}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Já fez ressonância magnética? {RESSOMAG}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Alguma alteração? {ALTRESSOMAG}       NÃO [0]       SIM [1]
20. Esplenotomizado? {ESPLECTO}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Esplenectomia: {TIPOESPLECTO}       Total [0]       Parcial [1]
21. Apresenta asma? {ASMA}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QASMA}       0[0]       1-3[1]       4-7[2]       8ou+ [3]  
 Faz uso regular de nebulização? {NEBU}       [0] NÃO       SIM [1]
22. Tem crises de dor? {CRISDOR}       [0] NÃO       SIM [1]  
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QCRISDOR}       0[0]       1-3[1]       4-7[2]       8ou+ [3]  
 Quando foi a última crise? {ULTRISDOR}       <1mês [0]       1-3m [1]       4m ou+[2]  
 Usa medicação para a dor? {MDOR}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Prescrita por um médico? {PRESMDOR}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Assistido por especialista em dor? {ESPECODOR}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Faz tratamento com hidroxinúria? {HIDROXI}       NÃO [0]       SIM [1]
23. Faz uso de alguma medicação? {MEDIC}       NÃO [0]       SIM [1]  
 Se SIM, qual? {DESCMEDIC}
- 
- Com que frequência? {FREQMEDIC}       Diário [0]       Dias alternados [1]       Semanal [2]  
 Quinzenal [3]       Mensal [4]       Bimestral [5]       Semestral [6]

24. Vaso-Oclusão: {VO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1] Quantas vezes? {QVO} \_\_\_\_\_  
 Fez uso de alguma medicação? {MVO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]
25. Retinopatia: {RETEN} ( ) NÃO [1] ( ) SIM [2]  
 Se SIM, fez uso de alguma medicação? {MRETEN} ( ) 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] ( ) Orite [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: {ALIOSSEA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {DESCALIOSSEA} \_\_\_\_\_
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? {HIEMODER} ( ) 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 tem 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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_